

Aus dem Institut für Zytobiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Identifizierung und Charakterisierung neuer Faktoren der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Viktoria Désirée Paul

aus Wetzlar

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 9. Mai 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Roland Lill

1. Korreferent: Prof. Dr. Uwe Maier

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Eisen-Schwefel (Fe-S) Proteine	5
1.2 Funktionen von Fe-S Proteinen und subzelluläre Lokalisation	6
1.3 Rli1, ein an vielen Prozessen beteiligtes Fe-S Protein	8
1.4 Die Biogenese zellulärer Fe-S Proteine	10
1.4.1 Entdeckung und grundlegendes Prinzip in pro- und eukaryotischen Organismen ...	10
1.4.2 Bedeutung der Mitochondrien für die Fe-S Proteinbiogenese im Zytosol	12
1.4.3 Die CIA-Maschinerie: Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine in Eukaryoten	14
1.4.4 Strukturelle Besonderheiten erklären die unterschiedlichen Funktionen der CIA-Faktoren bei der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese in der Hefe	15
1.5 Die humane CIA-Maschinerie weist zwei Besonderheiten auf	20
1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung	22
2 ERGEBNISSE	23
2.1 Systematische Identifizierung der Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie ..	23
2.1.1 Das CIA-Interaktom kann durch systematische Analyse nur partiell aufgeklärt werden	27
2.1.2 Die CIA-Maschinerie besteht aus drei Subkomplexen, die unterschiedlichen Phasen der Reifung zuzuordnen sind	29
2.1.3 Die Depletion eines Komplexpartners verringert die Stabilität des restlichen CIA-Subkomplexes	34
2.2 Identifizierung und Charakterisierung zweier neuer CIA-Interaktionspartner	36
2.2.1 Yae1 und Lto1: neue CIA-Faktoren oder Fe-S Zielproteine?	39
2.2.2 Die Interaktion von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex wird durch Depletion von Nbp35 verstärkt	41
2.2.3 Die Depletion von Yae1 und Lto1 beeinflusst die Reifung des Fe-S Proteins Rli1 ...	44
2.3 Identifizierung des physiologischen Transkriptionsstarts von <i>LTO1</i>	45
2.3.1 Bioinformatische Identifizierung des korrekten Transkriptionsstarts von <i>LTO1</i>	48
2.3.2 Biochemische und zellbiologische Verifizierung des <i>LTO1</i> Startcodons	49
2.4 Yae1 und Lto1 sind essentiell für die <i>de novo</i> Fe-S Cluster-Biogenese von Rli1, aber nicht für die Reifung anderer Fe-S Proteine	51
2.5 Sind Yae1 und Lto1 an der Reifung des Fe-S Proteins Rli1 oder an der Stabilisierung seiner Fe-S Cluster beteiligt?	57
2.5.1 Yae1 hat keine Funktion bei der Stabilisierung der beiden Fe-S Cluster von Rli1 ...	62
2.5.2 Yae1 und Lto1 fungieren auch unter anaeroben Bedingungen als spezifische Reifungsfaktoren für Rli1	64

2.6	Der humane YAE1D1-ORAOV1 Komplex fungiert ortholog zum Yae1-Lto1 Komplex der Hefe	67
3	DISKUSSION	70
3.1	Drei Subkomplexe innerhalb der CIA-Maschinerie erlauben die Maturierung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine	71
3.2	Der CIA-Targetingkomplex vermittelt den Kontakt zu Apoproteinen	75
3.3	Die systematische Interaktionsanalyse eignet sich nur bedingt für die Aufklärung der CIA-Wechselwirkungen	76
3.4	Yae1 und Lto1 sind neue CIA-Interaktionspartner	78
3.5	Yae1 und Lto1 sind neue CIA-Faktoren mit einer hohen Spezifität für das Fe-S Protein Rli1	80
3.6	Yae1 und Lto1 sind spezifische Reifungsfaktoren, aber keine Stabilisatoren der Fe-S Cluster von Rli1	83
3.7	Funktionen von Lto1 außerhalb der Fe-S Proteinbiogenese	85
4	AUSBLICK	87
5	MATERIAL UND METHODEN	89
5.1	Materialien	89
5.1.1	Geräte	89
5.1.2	Chemikalien	90
5.1.3	Verbrauchsmaterialien + Proteaseinhibitoren	91
5.1.4	Komplettsysteme	91
5.1.5	Enzyme	91
5.1.5.1	Restriktionsenzyme	91
5.1.5.2	Weitere Enzyme	92
5.1.6	Antikörper	92
5.1.7	Größenstandards für DNA und Proteine	92
5.2	Oligonukleotide	92
5.2.1	Oligonukleotide zur endogenen Modifikation von <i>S. cerevisiae</i>	92
5.2.2	Oligonukleotide zur Konstruktion von Genexpressionsvektoren in <i>S. cerevisiae</i>	94
5.3	Plasmide	94
5.3.1	Ausgangsplasmide	94
5.3.2	Plasmide zur Expression in <i>S. cerevisiae</i>	95
5.4	Bakterienstämme	96
5.5	Hefestämme	96
5.6	Medien	97
5.6.1	Medium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	97
5.6.2	Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	97
5.6.2.1	Kultivierung von Hefe unter anaeroben Bedingungen	98
5.7	Molekularbiologische Methoden	99
5.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	99
5.7.2	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	99
5.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	99

5.7.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	100
5.7.5	Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen	100
5.7.6	Modifikation von DNA	100
5.7.6.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	100
5.7.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten	101
5.8	Zellbiologische Methoden	101
5.8.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	101
5.8.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	101
5.8.3	Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> Lagerungskulturen	101
5.8.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und homologe Rekombination	102
5.8.4.1	Transformation von psd-Mutanten	102
5.8.5	Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels alkalischer Lyse	102
5.8.6	Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen	103
5.9	Proteinbiochemische Methoden	103
5.9.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	103
5.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	104
5.9.3	Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen	104
5.9.4	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot)	105
5.9.4.1	Immundetektion von Proteinen	105
5.10	Biochemische Methoden	105
5.10.1	Aktivitätsmessung zytosolischer Enzyme aus <i>S. cerevisiae</i>	105
5.10.1.1	Isopropylmalat Isomerase (Leu1)	106
5.10.1.2	Alkohol Dehydrogenase (ADH)	106
5.10.1.3	Sulfit Reduktase	107
5.10.2	Aktivitätsmessung der mitochondrialen Aconitase aus <i>S. cerevisiae</i>	107
5.10.3	Bestimmung der Luciferase Aktivität	108
5.10.4	Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose	108
5.10.5	(Ko)Immunpräzipitation (Ko-IP)	109
5.10.6	Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)	109
5.10.6.1	Lyse der Hefezellen unter Verwendung der Planetenmühle	109
5.10.6.2	Reinigung von Proteinkomplexen über zwei stationäre Phasen	110
5.10.6.3	Reduktion und Alkylierung von Proteinen	111
5.10.6.4	TCA-Präzipitation von Proteinen für die LC-MS/MS-Analyse	111
5.10.7	Blaulicht-vermittelter Abbau von Proteinen	112
5.10.8	Bestimmung der <i>de novo</i> Fe-S Proteinreifung in <i>S. cerevisiae</i>	112
5.10.8.1	Anaerober Einbau von ⁵⁵ Fe in Zielproteine	113
6	LITERATURANGABEN	114
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	126
8	ANHANG	127
8.1	Komponenten LF (<i>low fluorescence</i>)-Medium	127
8.2	TAP-MS Daten	128
8.2.1	Liste der allgemeinen Kontaminationen der TAP-MS	128
8.2.2	Gene Ontology (GO)-Analyse	129
8.3	Multisequenzvergleich der Proteine Yae1 und Lto1	129
9	PUBLIKATIONEN	131
10	TAGUNGSBEITRÄGE (AUSWAHL)	131

11	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	132
12	DANKSAGUNG.....	133

Zusammenfassung

Eisen-Schwefel (Fe-S) Cluster sind wichtige Kofaktoren zahlreicher Proteine und kommen in allen bekannten Lebensformen vor. Fe-S Proteine haben vielfältige Funktionen, u.a. beim Elektronentransport, in Enzymkatalysen und in der Genregulation. In neuester Zeit wurden überdies Fe-S Cluster-haltige Proteine mit einer Funktion in essentiellen zellulären Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Transkription und Ribosomenassemblierung entdeckt. Die Synthese der Fe-S Cluster und der anschließende Einbau in Apoproteine erfordern in Eukaryoten drei komplexe Synthesemaschinerien, die in den Mitochondrien und im Zytosol lokalisiert sind. Die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine wird durch das Zusammenwirken der mitochondrialen Eisen-Schwefel Cluster (ISC)-Assemblierungsmaschinerie, der ISC-Exportmaschinerie und der zytosolischen Eisen-Schwefel Protein Assemblierung (CIA)-Maschinerie ermöglicht. Die CIA-Maschinerie besteht bisher aus acht Proteinen, jedoch sind deren Interaktionen nicht umfassend beschrieben. Darüber hinaus ist wahrscheinlich, dass weitere CIA-Proteine an diesem komplexen Prozess beteiligt sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Interaktionen der bisher bekannten CIA-Proteine im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* analysiert. Dabei konnte in einer systematischen CIA-Protein Interaktionsanalyse gezeigt werden, dass die einzelnen CIA-Faktoren keinen Superkomplex bilden, sondern in drei funktionelle Subkomplexe unterteilt werden können, die unterschiedlichen Phasen der Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine zuzuordnen sind. Auf dem Gerüstproteinkomplex bestehend aus Cfd1-Nbp35 wird in der frühen Phase ein [4Fe-4S]-Cluster assembliert. Die für diese Reaktion nötigen Elektronen werden durch den CIA-Subkomplex Dre2-Tah18 bereitgestellt. In der späten Phase der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese wird der neu assemblierte Fe-S Cluster vom Gerüstproteinkomplex auf Apoproteine übertragen. Dieser Schritt erfolgt mithilfe des sog. „CIA-Targetingkomplexes“ bestehend aus Cia1, Cia2 und Met18. Der CIA-Faktor Nar1 nimmt dabei eine intermediäre, noch nicht genau definierte Funktion ein und interagiert sowohl mit den frühen als auch mit den späten Teilen der CIA-Maschinerie.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die essentiellen Faktoren Yae1 und Lto1 als neue Bestandteile der CIA-Maschinerie entdeckt und charakterisiert. Diese beiden Proteine zeichnen sich durch eine hohe Konservierung aus und bilden einen Komplex, der unter aeroben Bedingungen von besonderer Bedeutung ist. Yae1 und Lto1 wurden durch Auswertung der proteomweiten Interaktionsanalyse als Bindepartner der Komponenten des CIA-Targetingkomplexes identifiziert. Eine frühere systematische

Interaktionsstudie hat außerdem gezeigt, dass Yae1 und Lto1 mit dem Fe-S Protein Rli1 interagieren. Die Verbindung zur CIA-Maschinerie war jedoch bis dato nicht bekannt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Depletion von Yae1 oder Lto1 einen Reifungsdefekt des essentiellen Fe-S Proteins Rli1, nicht aber anderer zytosolischer oder nukleärer Zielproteine zur Folge hat. Darüber hinaus wurde unter Verwendung einer neu etablierten Methode gezeigt, dass Rli1 seine Fe-S Cluster auch nach raschem Abbau von Yae1 stabil gebunden hält, was gegen eine Rolle des Yae1 als Stabilisator der beiden Fe-S Cluster spricht. Diese Befunde legen nahe, dass den beiden Proteinen Yae1 und Lto1 eine Funktion als hoch spezifische Reifungsfaktoren für Rli1 zukommt. Der Komplex aus Yae1 und Lto1 ist in Eukaryoten konserviert und kann durch den humanen YAE1D1-ORAOV1 Komplex funktionell in der Hefe ersetzt werden. Diese Arbeit zeigt, dass bestimmte zytosolische Fe-S Proteine wie Rli1 offensichtlich nicht nur die generelle CIA-Maschinerie, sondern auch die Funktion weiterer spezifischer CIA-Komponenten für die Reifung ihrer Fe-S Cluster benötigen. Eine vergleichbar hohe Substratspezifität wie bei diesen neu entdeckten CIA-Faktoren wurde kürzlich auch für den humanen CIA-Faktor CIA2A beschrieben, der ausschließlich für die Maturierung des zytosolischen Fe-S Proteins IRP1 verantwortlich ist.

Zukünftige Untersuchungen müssen deshalb die interessante Frage angehen, ob nicht weitere CIA-Faktoren existieren, die auf bisher unbekannte Weise die Reifung eukaryotischer Fe-S Proteine unterstützen. Ein weiteres Ziel wird die Klärung der Frage sein, nach welchem molekularen Mechanismus solch hoch spezifische Faktoren den Fe-S Cluster-Einbau in Zielproteine gewährleisten.

Summary

Iron sulfur (Fe-S) clusters are important cofactors of numerous proteins and are present in all known forms of life. Fe-S proteins have various functions in electron transport, enzyme catalysis and gene regulation. Moreover, recently Fe-S cluster-containing proteins with a function in essential cellular processes such as DNA replication, DNA repair, transcription and ribosome function were detected. The synthesis of the Fe-S clusters and their subsequent insertion into apoproteins require three complex proteinaceous machineries in eukaryotes that are localized in the mitochondria and the cytosol. The maturation of cytosolic and nuclear Fe-S proteins is accomplished by the cooperation of the mitochondrial iron sulfur cluster (ISC) assembly machinery, the ISC export machinery and the cytosolic iron sulfur protein assembly (CIA) machinery. The CIA machinery consists of eight known proteins but their interactions with each other are not fully understood. Moreover it is likely that even more CIA proteins are involved in this complex biosynthetic process.

In the first part of my thesis the interactions of previously known CIA proteins were analyzed in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. By performing a systematic CIA protein interaction analysis it was shown that the individual CIA factors do not assemble a supercomplex. They rather can be divided into three functional subcomplexes that assist different stages in biogenesis of cytosolic and nuclear Fe-S proteins. The scaffold protein complex consisting of Cfd1-Nbp35 is required for the assembly of a [4Fe-4S]-cluster in the early phase of biogenesis. Electrons required for this reaction are provided by the CIA subcomplex Dre2-Tah18. In the late phase of cytosolic Fe-S protein biogenesis the newly assembled Fe-S cluster is transferred from the scaffold protein complex onto apoproteins. This step is performed by the so-called "CIA-targeting complex" consisting of Cia1, Cia2 and Met18. The CIA factor Nar1 fulfills an intermediary, so far not well-defined function and interacts with both the early and the late parts of the CIA machinery.

In the second part of my thesis the essential proteins Yae1 and Lto1 were discovered and characterized as new components of the CIA machinery. These two proteins are highly conserved and form a complex that is specifically required under aerobic conditions. In a proteome-wide interaction analysis Yae1 and Lto1 were identified as binding partners of the CIA-targeting complex. Moreover, a previous systematic interaction analysis has shown an association of Yae1-Lto1 with the Fe-S protein Rli1. However, a functional connection of these proteins to the CIA machinery has not been reported until now. It was shown in this work that the depletion of Yae1 or Lto1 results in a maturation defect of the essential Fe-S protein Rli1 but surprisingly no other cytosolic or nuclear target proteins were affected.

Additionally, by setting up a new technology I showed that the cofactors were stably associated with Rli1 when Yae1 was rapidly degraded, confirming that this protein is not a stabilization factor of the two Fe-S clusters. These findings suggest that Yae1 and Lto1 are highly specific maturation factors for Rli1. The Yae1-Lto1 complex is conserved in eukaryotes and can be functionally replaced by the human YAE1D1-ORAOV1 complex in yeast.

This work shows that certain cytosolic Fe-S proteins such as Rli1 obviously do not only depend on the general CIA machinery for the maturation of their Fe-S clusters, but also on the function of other more specialized CIA components. A comparable substrate specificity as observed for these two new CIA factors was described recently for the human CIA factor CIA2A, which is solely responsible for the maturation of the cytosolic Fe-S protein IRP1.

It has to be clarified whether additional CIA factors exist that support the dedicated maturation of eukaryotic Fe-S proteins. Furthermore, future studies will have to address the molecular mechanism by which such highly specific factors conduct the insertion of the Fe-S clusters into target proteins.

1 Einleitung

1.1 Eisen-Schwefel (Fe-S) Proteine

Viele Proteine benötigen Kofaktoren für ihre Funktion. Diese können organischer Natur sein, wie Nukleotide und Vitamine oder anorganischer Natur (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , $\text{Cu}^{1+/2+}$, $\text{Fe}^{2+/3+}$). Unter den letztgenannten werden die Fe-S Cluster als wohl älteste und vielseitigste Kofaktoren beschrieben (Rees & Howard, 2003). Sie haben Funktionen im Elektronentransfer, der Enzymkatalyse, regulatorischen Prozessen, sowie als Stabilisatoren von Proteinstrukturen (Beinert *et al.*, 1997; Lill & Muhlenhoff, 2008; Roche *et al.*, 2013). Die einfachsten Versionen dieser anorganischen Kofaktoren sind der rhombische [2Fe-2S]- und der kubische [4Fe-4S]-Cluster, die aus $\text{Fe}^{2+/3+}$ und S^{2-} zusammengesetzt sind (**Abb. 1.1**). Diese einfacheren Varianten sind meist durch die Koordination des Eisens über Cystein- oder Histidinreste im Protein integriert, obwohl auch alternative Liganden komplizierterer Fe-S Cluster bekannt sind (Asp, Arg, Ser, CO, CN^-). Komplexe Fe-S Cluster werden oft durch die Addition der einfachen Cluster, z.B. zweier [4Fe-4S]-Cluster, und die Integration zusätzlicher Metallionen, wie Molybdän oder Nickel, generiert (Rees, 2002). Ein bekanntes Beispiel dafür ist der [8Fe-7S] P-Cluster der Nitrogenase in Stickstoff-fixierenden Bakterien (Chan *et al.*, 1993).

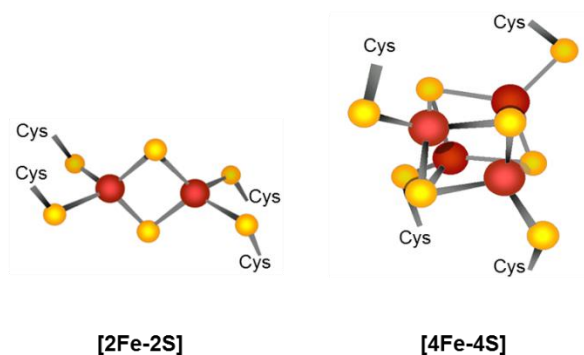


Abb. 1.1 Strukturen der einfachsten Fe-S Cluster-Typen. Gezeigt sind die Strukturen des rhombischen [2Fe-2S]- und des kubischen [4Fe-4S]-Clusters (Balk & Lill, 2004).

Zu den ersten charakterisierten Fe-S Proteinen gehören pflanzliche, bakterielle und eukaryotische Ferredoxine und die Atmungskettenkomplexe I-III der Bakterien und Mitochondrien. Zunächst wurde angenommen, dass sich die Fe-S Cluster spontan *in vivo* assemblieren und ihre Insertion in Apoproteine ohne weitere Hilfe erfolgt (Malkin & Rabinowitz, 1966). Dieses Modell basierte auf klassischen Experimenten, in denen eine *in vitro* Rekonstitution eines Fe-S Holoproteins mit reduziertem Eisen (Fe^{2+}) und einer Sulfidquelle gelungen war. Allerdings sind hierzu sauerstofffreie Bedingungen und unphysiologisch hohe Eisen- und Sulfidkonzentrationen nötig, die auf die Zelle toxisch wirken würden.

Durch genetische, biochemische und zellbiologische Studien der 1990er Jahre konnte allerdings gezeigt werden, dass die Reifung der Fe-S Proteine in bakteriellen, als auch in eukaryotischen Zellen nicht spontan erfolgt, sondern das Resultat eines komplexen und wohl geordneten Prozesses mit zahlreichen Proteinkomponenten ist (Johnson *et al.*, 2005).

1.2 Funktionen von Fe-S Proteinen und subzelluläre Lokalisation

Fe-S Proteine findet man in allen möglichen Lebensformen. Sie haben Funktionen in einer Vielzahl essentieller Prozesse und sind in unterschiedlichen Kompartimenten der eukaryotischen Zelle zu finden (**Abb. 1.2**).

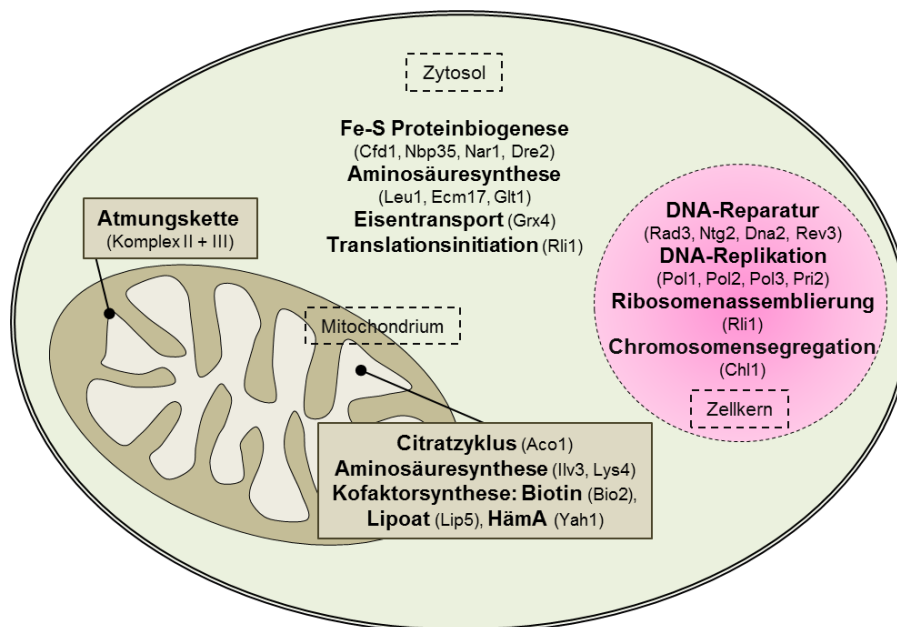


Abb. 1.2 Viele essentielle Prozesse in der eukaryotischen Zelle sind auf die Funktion von Fe-S Proteinen angewiesen. Gezeigt sind Beispiele von Fe-S Proteinen aus *S. cerevisiae*, ihre subzelluläre Lokalisation und der Prozess, in dem sie benötigt werden. Modifiziert nach (Lill & Muhlenhoff, 2006).

Die wohl bekannteste Funktion von Fe-S Proteinen, der Transfer von Elektronen, basiert auf der Eigenschaft des Eisens, zwischen den beiden Redoxzuständen +2 und +3 hin und her zu schalten (Beinert *et al.*, 1997). Damit können Fe-S Cluster in einer Vielzahl biologischer Prozesse als Donoren oder Akzeptoren für Elektronen fungieren. Beispiele für redoxaktive Fe-S Proteine stellen die Ferredoxine, z.B. Yah1 in *S. cerevisiae*, und die Hydrogenasen dar. Die schrittweise Übertragung von Elektronen ist grundlegend für die Funktionen des Photosystems I, sowie der bakteriellen und mitochondrialen Atmungskette (Ayala-Castro *et al.*, 2008).

Fe-S Proteine haben überdies auch Funktionen in einer Vielzahl von Nicht-Redox-Prozessen. Ein gut beschriebenes Beispiel ist die mitochondriale Aconitase, ein Enzym des Zitronensäurezyklus. Sie katalysiert die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat unter Abspaltung und sofortiger Addition von H_2O , wobei ein Eisenatom seines [4Fe-4S]-Clusters als Lewis-Säure fungiert. Weitere Beispiele sind die Radikal SAM (S-Adenosylmethionin) Enzyme, wie die Biotin Synthase (Bio2) und Liponsäure Synthase (Lip5) der mitochondrialen Matrix, die beide zwei Fe-S Cluster koordinieren. Vermutlich wird einer der beiden Fe-S Cluster während der Katalyse abgebaut und dient als Schwefelquelle für die Bildung der Produkte Biotin bzw. Liponsäure (Booker *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2013). Zusätzlich findet man in der mitochondrialen Matrix die beiden [4Fe-4S]-Proteine Ilv3 und Lys4, die an der Bildung verzweigtkettiger Aminosäuren bzw. der Biosynthese von Lysin beteiligt sind. Auch im Zytosol der Hefe gibt es Fe-S Proteine, die eine Rolle bei der Biosynthese von Aminosäuren spielen. Die Isopropylmalat Isomerase (Leu1), die Glutamat Synthase (Glt1) und eine Untereinheit der Sulfid Reduktase (Ecm17) koordinieren einen [4Fe-4S]-Cluster und katalysieren Schritte der Biosynthese von Leucin, Glutamat und Methionin. Weitere Beispiele für zytosolische Fe-S Proteine sind die Komponenten der CIA-Maschinerie Cfd1, Nbp35, Dre2 und Nar1. Diese vier Faktoren sind für die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine essentiell.

Als dritte Funktion von Fe-S Clustern ist ihre Rolle als Sensoren und Regulatoren der Genexpression zu nennen. Zum Beispiel verwendet das Säugerprotein IRP1 (*iron regulatory protein 1*, ACO1) einen Fe-S Cluster als Eisensensor für eine posttranskriptionale Regulation der Expression von Komponenten der zellulären Aufnahme und Lagerung von Eisen. Ist ausreichend Eisen in der Zelle zugegen, koordiniert dieses Protein einen [4Fe-4S]-Cluster und hat die Funktion einer zytosolischen Aconitase. Unter Eisenmangelbedingungen hingegen, verliert das Protein seinen labilen Fe-S Cluster und bindet an Eisen-regulierbare Elemente (IRE = *iron responsive elements*) verschiedener mRNAs von Proteinen, die an der Eisenaufnahme, Lagerung und Verteilung des Eisens innerhalb der Zelle beteiligt sind (Rouault, 2006; Walden *et al.*, 2006; Wallander *et al.*, 2006). Je nachdem, ob das apo-IRP1 an IREs im 5'- oder im 3'-nicht-translatierten Bereich von mRNAs bindet, führt dies zu einem Translationsblock, oder aber zu einer erhöhten Translation, da die Bindung im 3'-Bereich die mRNA vor Abbau schützt. Damit wird gewährleistet, dass bei Eisenmangel Eisen aus Speicherproteinen verfügbar gemacht und gleichzeitig die Eisenaufnahme in die Zelle erhöht wird. Die bakteriellen Transkriptionsfaktoren FNR, IscR und SoxR hingegen erkennen die Konzentrationen von O_2 , Fe-S Clustern, sowie Superoxid (O_2^-)/Stickstoffmonoxid, und aktivieren oder reprimieren in Abhängigkeit

davon die Expression bestimmter Gene. Im Falle von FNR und IscR basiert das Umschalten von aktiviertem zu inaktiviertem Zustand auf der Anwesenheit oder Abwesenheit eines Fe-S Clusters, wohingegen in SoxR der Redoxzustand des [2Fe-2S]-Clusters das Signal darstellt (Imlay, 2008).

Trotz einer ständig steigenden Zahl neuer Fe-S Proteine ist in vielen Fällen nicht bekannt, welche Rolle der Kofaktor für die Funktion des Proteins spielt. Zum Teil wird eine strukturgebende Funktion angenommen. Dies gilt vor allem für die im Zellkern lokalisierten Proteine mit Beteiligung am DNA-Metabolismus. Die ATP-abhängigen DNA-Helikasen (Rad3, Chl1, Dna2), sowie die katalytischen Untereinheiten von DNA-Polymerasen (Pol1, Pol2, Pol3, Rev3) und die große Untereinheit der Primase (Pri2) koordinieren einen [4Fe-4S]-Cluster in der Hefe (Klinge *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2012b; Pugh *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2006; White & Dillingham, 2012; Yeeles *et al.*, 2009). Auch das im Zellkern lokalisierte DNA-Reparaturenzym Ntg2 (DNA-Glycosylase) benötigt einen [4Fe-4S]-Cluster für seine Funktion (Stehling *et al.*, 2012). Die Reifung dieser Fe-S Proteine trägt damit beträchtlich zur Erhaltung genomischer Stabilität bei.

1.3 Rli1, ein an vielen Prozessen beteiligtes Fe-S Protein

Die Fe-S Proteinbiogenese spielt nicht nur eine Rolle bei der Erhaltung der genomischen Stabilität, sondern auch bei der Translation von Proteinen. Das ribosomale Protein Rli1 war das erste essentielle Fe-S Protein, das außerhalb der Mitochondrien detektiert wurde und erklärt u.a., warum der Prozess der Fe-S Proteinbiogenese, und damit die Mitochondrien, unabdingbar für das Überleben der eukaryotischen Zelle sind (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Diese Beobachtung wird in Abschnitt 1.4.2 genauer beschrieben. Da die Untersuchung der Reifung dieses speziellen Fe-S Proteins einen Großteil der vorliegenden Arbeit ausmacht, wird an dieser Stelle gezielt auf die Eigenschaften des Rli1 eingegangen.

Rli1 bzw. ABCE1 in höheren Eukaryoten ist das einzige Mitglied der Unterfamilie E von ABC-Enzymen (ABC = *ATP binding cassette*) und beeinflusst nachweislich die Aktivität der RNase-L des angeborenen Immunsystems, was zu seiner Namensgebung als RNase-L Inhibitor (Rli1) führte (Bisbal *et al.*, 1995). RNase-L ist ein antivirales Enzym, das mRNA und einzelsträngige virale RNA in infizierten Zellen abbaut (Silverman, 2007). Rli1 wurde aber auch als Wirtsprotein beschrieben, das eine Rolle bei der Reifung unreifer Capside des humanen Immundefizienzvirus (HIV) spielt (Zimmerman *et al.*, 2002). Obwohl diese Eigenschaften Rli1 zu einem spannenden Faktor für die biomedizinische Forschung machten, war davon auszugehen, dass diese Funktionen erst im Laufe der Evolution erworben wurden und die physiologische Funktion dieses Proteins noch nicht geklärt war. Rli1 kommt nämlich auch in allen Archaeobakterien, nicht

aber in Eubakterien, vor. Die eukaryotischen und archaebakteriellen Rli1 Proteine zeigen eine außerordentlich hohe Konservierung mit 45-50 % Sequenzidentität auf, was eine Funktion von Rli1 in einem fundamentalen, in Eukaryoten und Archaeen konservierten, Prozess nahelegt (Karcher *et al.*, 2005; Kerr, 2004). Dafür spricht auch, dass Rli1 in allen untersuchten Organismen essentiell ist (Coelho *et al.*, 2005; Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004).

Durch die Beiträge mehrerer Labore in den vergangenen Jahren konnte Rli1 als spezieller Translationsfaktor mit mehreren Aufgaben charakterisiert werden. Eine Funktion von Rli1 bei der Biogenese und Reifung von Ribosomen konnte durch Depletionsversuche gezeigt werden, in denen die Verarbeitung von rRNA und der Export ribosomaler Untereinheiten aus dem Kern beeinträchtigt war (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Durch Interaktionsstudien wurde zudem eine Funktion von Rli1 bei der Initiation und Termination der Translation belegt (Chen *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2004; Khoshnevis *et al.*, 2010; Shoemaker & Green, 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass Rli1 auch in der letzten Phase der Translation, dem Recycling der ribosomalen Untereinheiten, eine wichtige Rolle spielt (Becker *et al.*, 2012; Pisareva *et al.*, 2011; Shoemaker & Green, 2011).

Durch biophysikalische, biochemische und zellbiologische Analysen konnten die einzelnen Domänen des Rli1 näher charakterisiert werden. Neben den beiden ABC-ATPase Domänen besitzt Rli1 eine N-terminale Domäne mit acht konservierten Cysteinen (Barthelme *et al.*, 2007; Karcher *et al.*, 2008). Diese ordnen sich in einem Ferredoxin-ähnlichen Motiv (CPX_nCX₂CX₂C) und in dem einzigartigen ABCE1-Motiv (CXPX₂CX₃CX_nCP) an, die beide einen [4Fe-4S]-Cluster koordinieren (**Abb. 1.3**). Interessanterweise sind nur sieben der acht Fe-S Cluster-koordinierenden Cysteine essentiell für das Überleben der Zelle. Eine zusätzliche Besonderheit wurde für das Cystein an Position 38 im Hefeprotein entdeckt. Im Falle einer Mutation des Fe-S Cluster-koordinierenden Cystein 29, kann diese Aminosäure die Ligandenfunktion übernehmen (Barthelme *et al.*, 2007). Beide ABC-ATPase Domänen, sowie beide Fe-S Cluster sind kritisch für die Funktion des Rli1. Aufgrund der Abhängigkeit von diesen Kofaktoren, wurde Rli1 als Achilles' Verse vieler aerober Organismen beschrieben (Alhebshi *et al.*, 2012). Die Schädigung dieser empfindlichen Fe-S Cluster durch oxidativen Stress und die damit einhergehende Beeinträchtigung der Translation, wurde in direkten Einklang mit der beobachteten Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies auf das Zellwachstum gebracht. Eine strukturelle Analyse aus dem Jahr 2012 zeigte erstmals die Rolle der ABC-ATPase Rli1 bei der Koordination von Translationstermination, Recycling der ribosomalen Untereinheiten und Re-Initiation auf (Becker *et al.*, 2012). Dabei triggert die Fe-S Cluster-Domäne eine allosterische

Kaskade, die aktiv den Prozess der Termination mit dem Recycling ribosomaler Untereinheiten verknüpft (Shoemaker & Green, 2011). Die Hydrolyse von ATP führt dabei zu Konformationsänderungen des Rli1, die wiederum zu strukturellen Änderungen innerhalb der beiden Ribosomenuntereinheiten führen und damit die Translationstermination und Spaltung der Untereinheiten bewirken.

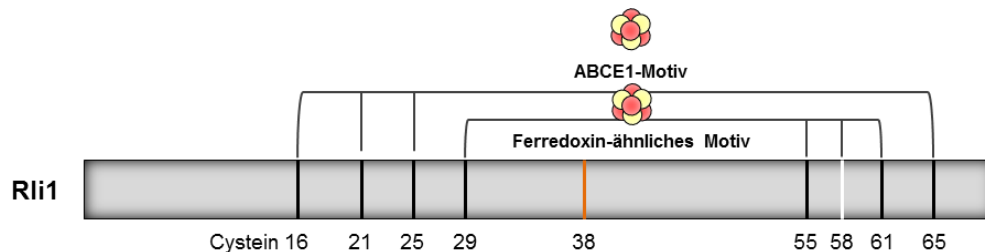


Abb. 1.3 Koordination der beiden Fe-S Kofaktoren am N-Terminus von Rli1. Gezeigt ist der N-Terminus von Rli1 aus *S. cerevisiae*. Fe-S Cluster-koordinierende Cysteine sind markiert und nummeriert. Alle koordinierenden Cysteine, außer Cys58, sind essentiell. Das Cystein an Position 38 kann die Fe-S Cluster-Koordination im Falle einer Mutation von Cys29 übernehmen. Modifiziert nach (Barthelme *et al.*, 2007).

1.4 Die Biogenese zellulärer Fe-S Proteine

1.4.1 Entdeckung und grundlegendes Prinzip in pro- und eukaryotischen Organismen

Obwohl Fe-S Cluster *in vitro* auf Apoproteinen aus Eisen- und Sulfidionen unter anaeroben Bedingungen chemisch rekonstituiert werden können, nutzen alle Organismen komplexe Protein-Synthesemaschinerien zur Fe-S Cluster-Assemblierung und deren Insertion in Zielproteine.

Die ersten Komponenten des Vorgangs der Fe-S Cluster-Biosynthese wurden im Stickstoff-fixierenden Bakterium *Azotobacter vinelandii* entdeckt (Zheng *et al.*, 1993). In diesen Bakterien erlaubt das NIF-System (*nitrogen fixation*) spezifisch die Reifung des Nitrogenase-Komplexes, welcher der Reduktion atmosphärischen Stickstoffs dient. Es konnte gezeigt werden, dass die Cystein Desulfurase NifS durch eine Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Umwandlung von Cystein zu Alanin Sulfidionen für die Fe-S Cluster-Assemblierung generiert (Zheng *et al.*, 1994). Die Entdeckung eines Enzym-gebundenen Persulfid-Intermediats, das aus Cystein hervorgeht, war grundlegend für die Aufklärung der Fe-S Cluster-Assemblierung in biologischen Systemen. Die Deletion von NifS war jedoch überraschenderweise nicht letal für *A. vinelandii*, sondern führte nur zu einer Verminderung der Nitrogenase-Aktivität und des Wachstums. Dies ließ vermuten, dass mindestens ein weiteres System zur Biogenese von Fe-S Proteinen existiert. Tatsächlich wurden zwei weitere bakterielle Systeme zur Bildung Fe-S Cluster-haltiger Proteine entdeckt: die ISC (*iron sulfur cluster*)

Assemblierungsmaschinerie und das SUF (*sulfur utilization factor*) System (Ayala-Castro *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2005; Py & Barras, 2010; Roche *et al.*, 2013). In manchen Bakterien, wie *E. coli*, sind das ISC- und das SUF-System gleichzeitig vorhanden, wobei das SUF-System die Fe-S Proteinbiogenese unter Eisenmangel oder unter oxidativem Stress vermittelt. In allen drei Systemen (NIF, SUF, ISC) erfolgt die *in vivo* Fe-S Cluster-Synthese über zwei Stufen, in denen mehrere Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben (**Abb. 1.4**).

Im ersten Schritt wird mithilfe einer Cystein Desulfurase ein Persulfid bereitgestellt und ein Fe-S Cluster *de novo* auf einem Gerüstprotein zusammengesetzt und transient gebunden (Agar *et al.*, 2000). Da der Schwefel im Cystein im Redoxzustand S^0 und nicht wie erforderlich, im Redoxzustand S^{2-} vorliegt, erfordert diese Reaktion, neben der Bereitstellung von Eisen, auch Reduktionsäquivalente. Jedoch konnte bisher noch kein Nachweis von Reduktionsäquivalenten im SUF-System erbracht werden. Der zweite Schritt beinhaltet den Cluster-Transfer auf Apoproteine und den anschließenden Einbau in das Zielprotein (Yuvaniyama *et al.*, 2000).

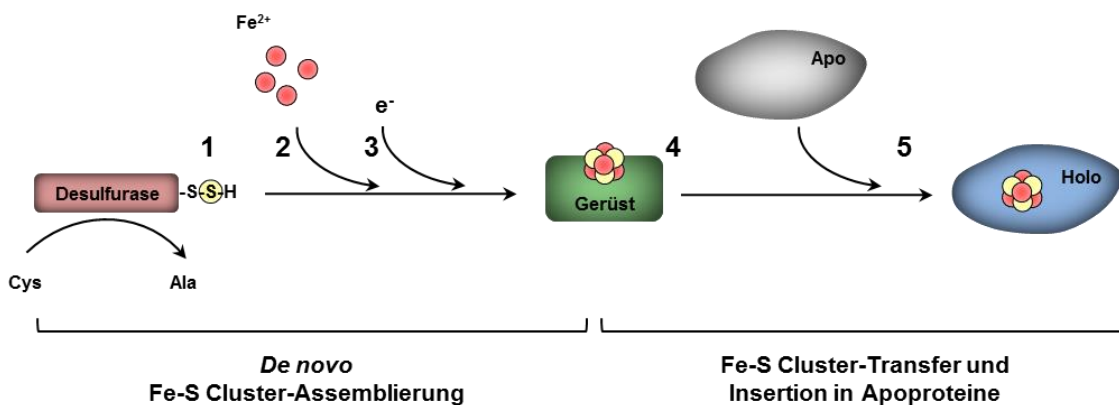


Abb. 1.4 Prinzip der Fe-S Proteinbiogenese. Die Biogenese von Fe-S Proteinen in Pro- und Eukaryoten kann durch unterschiedliche Maschinerien ausgeführt werden. Trotz verschiedener Systeme kann der Prozess in zwei Stufen unterteilt werden: die *de novo* Assemblierung eines Fe-S Clusters auf einem Gerüstprotein und der anschließende Transfer und die Insertion in Apoproteine. In beiden Stufen werden mehrere Proteine und Kofaktoren benötigt. **Folgende Schritte sind in der Abbildung mit Nummern markiert. (1) Bereitstellung des Schwefels.** Die Cystein Desulfurase wandelt Cystein zu Alanin um und koordiniert ein Persulfid über einen konservierten Cysteinrest. Dieses Persulfid wird auf Cysteinreste von Helferproteinen oder des Gerüstproteins übertragen. **(2) Bereitstellung des Eisens.** Das Eisen liegt nicht frei in Lösung vor. Eisendonoren erlauben den gezielten Transport zu Gerüstproteinen. **(3) Bereitstellung von Elektronen.** Für die Reduktion von S^0 (Zustand im Cystein) zu S^{2-} (Zustand im Fe-S Cluster) müssen Reduktionsäquivalente geliefert werden. **(4) Cluster-Assemblierung auf Gerüstproteinen.** Diese Proteine dienen als Plattform für die *de novo* Fe-S Cluster-Biosynthese. Sie zeichnen sich durch konservierte Cysteinreste aus, die den Fe-S Cluster transient binden. **(5) Cluster-Transfer zu Apoproteinen.** Für den Transport des neu assemblierten Fe-S Clusters vom Gerüstprotein zu Apoproteinen und deren anschließende Insertion werden weitere Komponenten benötigt. Modifiziert nach (Lill, 2009).

Im Anschluss an die Entdeckung der Fe-S Cluster-Assemblierung in Bakterien, fand man auch im eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* Gene, die Ähnlichkeit zu den Genen der bakteriellen ISC-Maschinerie hatten und eine Funktion in der Fe-S Proteinbiogenese innerhalb der Mitochondrien ausüben (Craig & Marszalek, 2002; Kispal *et al.*, 1999; Strain *et al.*, 1998).

Es zeigte sich hierbei, dass im Laufe der Evolution zwei der drei bakteriellen Synthesemaschinerien von der eukaryotischen Zelle übernommen wurden, das ISC-System der Mitochondrien und das SUF-System der Plastiden. Zusätzlich wurden zwei weitere eukaryotische Synthesemaschinerien entdeckt, die mitochondriale ISC-Exportmaschinerie und die zytosolische Fe-S Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA = *cytosolic iron sulfur protein assembly*) (Balk & Lill, 2004). Beide haben eine Funktion bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine und sind von der mitochondrialen ISC-Maschinerie abhängig. Der erste Faktor zur Reifung zytosolischer und nukleärer Zielproteine wurde im Jahr 2003 beschrieben (Roy *et al.*, 2003). Darauf folgte die Identifikation und Charakterisierung mehrerer Proteine, die als zytosolische Fe-S Protein-Assemblierungsmaschinerie zusammengefasst werden (Balk *et al.*, 2005; Balk *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2005; Netz *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2010; Stehling *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur CIA-Maschinerie, die nur an der Reifung zytosolischer und nukleärer Zielproteine beteiligt ist, ist die in den Mitochondrien lokalisierte ISC-Maschinerie für die Reifung aller zellulären Fe-S Proteine essentiell (Kispal *et al.*, 1999).

1.4.2 Bedeutung der Mitochondrien für die Fe-S Proteinbiogenese im Zytosol

Die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine basiert auf der Zusammenarbeit dreier Protein-Maschinerien: der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie, der ISC-Exportmaschinerie und der zytosolischen Fe-S Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA) (**Abb. 1.5**).

Damit wird die Notwendigkeit der Mitochondrien für das Überleben der Zelle u.a. mit ihrer Rolle bei der Reifung von Fe-S Proteinen, die am DNA-Metabolismus teilhaben, erklärt (Stehling & Lill, 2013; Stehling *et al.*, 2012).

Es wurde gezeigt, dass die mitochondrialen ISC-Komponenten Nfs1 und das Gerüstprotein Isu1 essentiell für die Biogenese extra-mitochondrialer Fe-S Proteine sind (Biederbick *et al.*, 2006; Gerber *et al.*, 2004; Kispal *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Abhängigkeit von der Cystein Desulfurase Nfs1, geht man davon aus, dass eine schwefelhaltige Komponente X, aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert wird und dort die Assemblierung neuer Fe-S Cluster erlaubt (**Abb. 1.5**). Obwohl diese Komponente nicht weiter charakterisiert ist, weiß man, dass der Export aus dem Mitochondrium ins Zytosol durch den ABC Transporter Atm1 vermittelt wird (Kispal *et al.*, 1999; Ponderre *et al.*, 2006; Teschner *et al.*, 2010). Zusätzlich erfordert dieser Prozess die FAD-abhängige Sulphydryloxidase Erv1, die, getrennt von ihrer Aufgabe bei der Fe-S Cluster-Biogenese, die Bildung von Disulfidbrücken während des Mia40-abhängigen Imports in den Intermembranraum katalysiert (Lange *et al.*, 2001; Mesecke *et al.*, 2005). Die dritte Komponente der ISC-Exportmaschinerie ist Glutathion (GSH). Es konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung der GSH-Konzentration in Hefe den gleichen Phänotyp zur Folge hat, wie die Depletion von Erv1 und Atm1, nämlich den Verlust der extra-mitochondrialen Fe-S Proteinbiogenese bei intakter mitochondrialer Biogenese (Sipos *et al.*, 2002). Nach dem Transport der bisher unbekannten Komponente ins Zytosol, übernehmen die Faktoren der CIA-Maschinerie die Biogenese der zytosolischen und nukleären Fe-S Proteine.

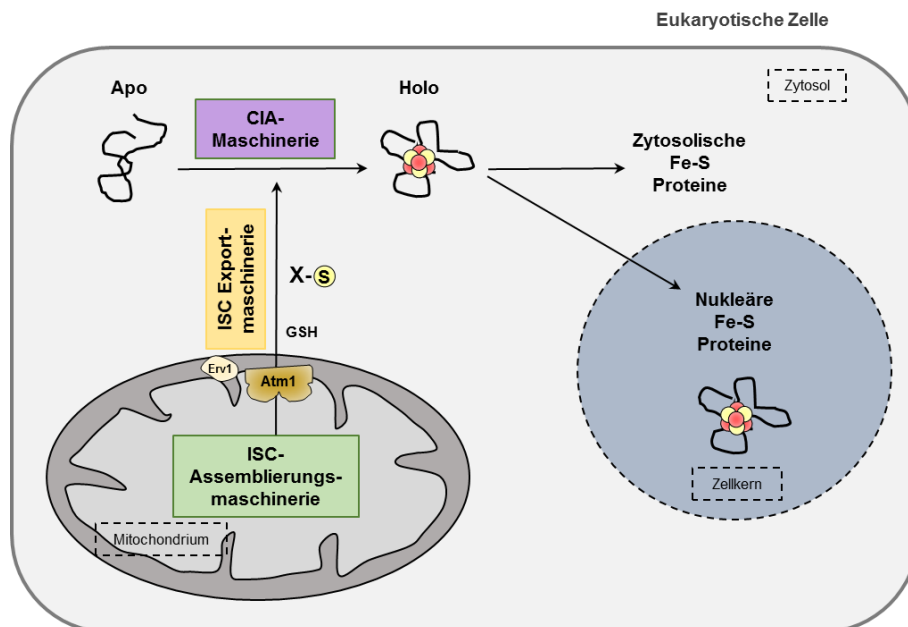


Abb. 1.5 Eine von der mitochondrialen ISC-Maschinerie gebildete Komponente X ist essentiell für die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine in Eukaryoten. Die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine ist abhängig von der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie und der ISC-Exportmaschinerie. Der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte ABC Transporter Atm1 exportiert eine schwefelhaltige Komponente X ins Zytosol, die für die Maturierung von Fe-S Proteinen im Zytosol benötigt wird. Dieser Export ist abhängig von Glutathion (GSH) und der im Intermembranraum lokalisierten Sulphydryloxidase Erv1. Im Zytosol wird die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine durch die Komponenten der CIA-Maschinerie katalysiert.

1.4.3 Die CIA-Maschinerie: Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine in Eukaryoten

Bisher wurden acht Proteine der Hefe als Komponenten der CIA-Maschinerie charakterisiert. Durch die Analyse der humanen Homologen wurde bestätigt, dass sowohl die einzelnen Komponenten, als auch der zugrunde liegende Mechanismus der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese hoch konserviert sind (Sharma *et al.*, 2010). Die gesamte Biosynthese kann, vergleichbar mit dem Vorgang der mitochondrialen Fe-S Cluster-Biogenese, in zwei Schritte unterteilt werden (**Abb. 1.6**).

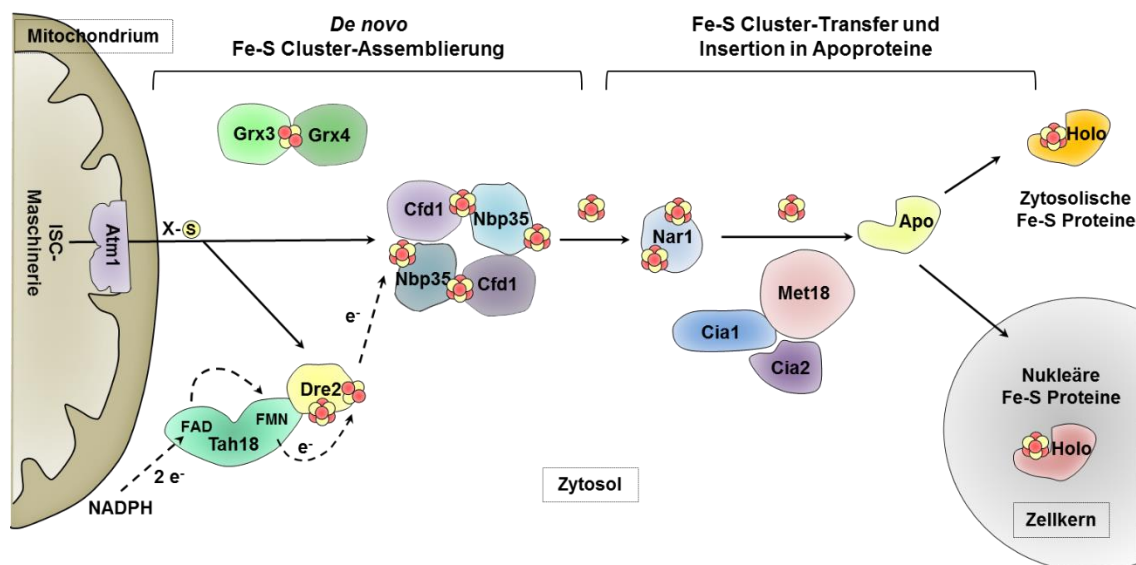


Abb. 1.6 Vereinfachtes Modell der Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine durch die CIA-Maschinerie im Modellorganismus *S. cerevisiae*. Der Reifungsvorgang kann in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird ein verbrückender [4Fe-4S]-Cluster auf dem heterotetrameren Gerüstproteincomplex aus Cfd1 und Nbp35 assembliert. Der für diese Reaktion benötigte Schwefel wird durch den Atm1-vermittelten Export der unbekannten Komponente X aus der mitochondrialen Matrix bereitgestellt. Für diese Reaktion benötigte Elektronen werden über eine Elektronentransportkette bestehend aus NADPH, Tah18 und Dre2 geliefert. Im zweiten Schritt wird der verbrückende Fe-S Cluster vom Gerüstproteincomplex auf Apoproteine übertragen. Dieser Schritt erfordert weitere Komponenten, wie das Fe-S Protein Nar1 und den CIA-Targetingkomplex bestehend aus Cia1-Cia2-Met18. Letztgenannte Proteine vermitteln den direkten Kontakt mit Apoproteinen und stellen die Insertion des Clusters in diese sicher. Die Biogenese extra-mitochondrialer Zielproteine erfordert überdies die zytosolischen Monothiol-Glutaredoxine Grx3-Grx4, welche einen verbrückenden [2Fe-2S]-Cluster koordinieren, und wahrscheinlich als Eisendonator in diesem Prozess dienen. Modifiziert nach (Netz *et al.*, 2010).

Im ersten Schritt wird ein [4Fe-4S]-Cluster an einem Gerüstproteincomplex bestehend aus den P-Loop NTPasen Cfd1 und Nbp35 assembliert und transient gebunden (Hausmann *et al.*, 2005; Netz *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2003). Elektronen für diese Reaktion werden durch die Elektronentransportkette aus NADPH, der Diflavinreduktase Tah18 und dem Fe-S Protein Dre2 bereitgestellt (Netz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Im zweiten Schritt wird der transient an Cfd1-Nbp35 gebundene [4Fe-4S]-Cluster mithilfe des Hydrogenase-ähnlichen Proteins Nar1 auf Apoproteine übertragen (Balk *et al.*,

2004). Der zusätzlich in diesem Schritt benötigte CIA-Targetingkomplex bestehend aus dem β -Propeller Protein Cia1, Cia2 und dem *HEAT-Repeat* Protein Met18 vermittelt den direkten Kontakt zu Apoproteinen und erlaubt schließlich die Insertion des neu assemblierten Fe-S Clusters in die Zielproteine (Balk *et al.*, 2005; Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2012; Weerapana *et al.*, 2010).

Zusätzlich hängt die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine von den zytosolischen Monothiol-Glutaredoxinen Grx3-Grx4 ab (Haunhorst *et al.*, 2013; Muhlenhoff *et al.*, 2010). Diese haben in der Zelle eine Funktion als Eisensensoren und vermitteln die Umwandlung des Eisens aus dem labilen Eisenpool in eine bioverfügbare Form. Damit sind sie essentiell für die Reifung aller Klassen eisenhaltiger Proteine, weshalb sie nicht als CIA-Faktoren bezeichnet werden. Die Depletion von Grx3/4 führt zu einer Beeinträchtigung von Fe-S-, Häm- und anderen Eisen-enthaltenden Faktoren, wobei die Funktion beider Proteine durch die Koordination eines verbrückenden Glutathion-haltigen [2Fe-2S]-Clusters gewährleistet wird (Haunhorst *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009; Muhlenhoff *et al.*, 2010). Überraschenderweise ist die Reifung dieses besonderen Fe-S Clusters von Grx3/4 nicht abhängig von der CIA-Maschinerie (Lill & Muhlenhoff, 2008). Diese CIA-unabhängige Form der Fe-S Cluster-Assemblierung lässt sich vereinbaren mit der Beobachtung, dass die CIA-Maschinerie keinen Einfluss auf die intrazelluläre Eisenregulation in der Hefe hat (Hausmann *et al.*, 2008; Kaplan & Kaplan, 2009). Der genaue Mechanismus der Aktivierung des Eisens durch Grx3/4 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Denkbar wäre, dass entweder der Eisenanteil des Fe-S Clusters genutzt wird, um anschließend in eisenabhängige Proteine eingebaut zu werden, oder der Fe-S Cluster direkt die Aktivierung des zytosolischen Eisens veranlasst (Muhlenhoff *et al.*, 2010).

1.4.4 Strukturelle Besonderheiten erklären die unterschiedlichen Funktionen der CIA-Faktoren bei der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese in der Hefe

Cfd1 und Nbp35 gehören zur Mrp/MinD Familie der P-Loop NTPasen (Leipe *et al.*, 2002). Sie bilden einen heterotetrameren Komplex, der zwei unterschiedliche Paare von [4Fe-4S]-Clustern koordiniert (Hausmann *et al.*, 2005; Netz *et al.*, 2012a; Netz *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2003). Die Koordination des einen Clusters erfolgt durch ein Ferredoxin-ähnliches Motiv (CX₁₃CX₂CX₅C) am N-Terminus von Nbp35 (**Abb. 1.7**). Die Reifung dieses Fe-S Clusters ist abhängig von der Elektronentransportkette bestehend aus NADPH, Tah18 und Dre2 (Netz *et al.*, 2010) (**Abb. 1.6**). Ein weiterer [4Fe-4S]-Cluster bindet an das C-terminale, konservierte CX₂C-Motiv von Cfd1 und Nbp35 und verbrückt damit die beiden Komplexpartner (Netz *et al.*, 2012a).

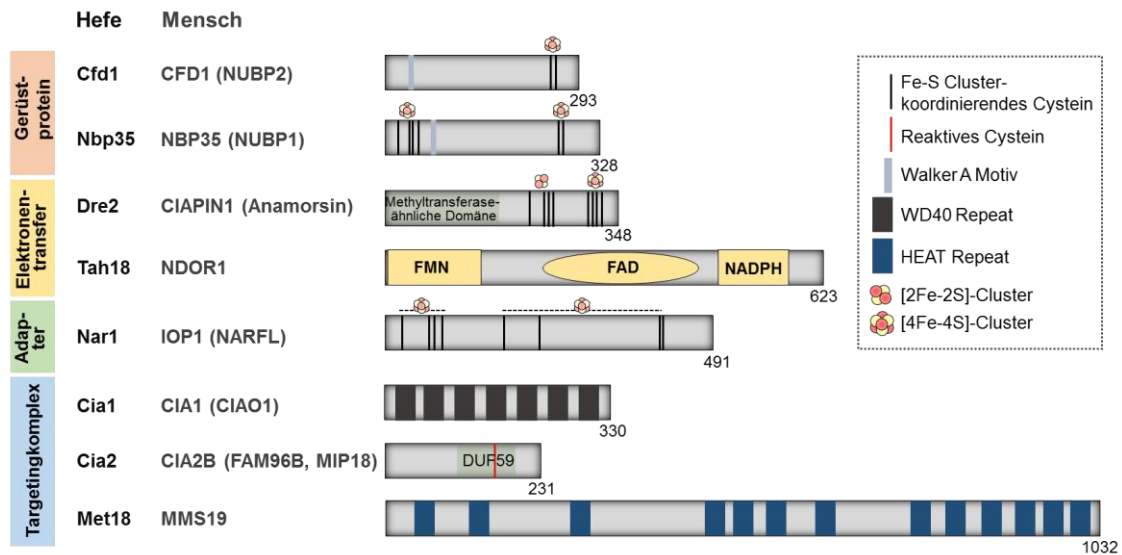


Abb. 1.7 Domänenstruktur der CIA-Faktoren in *S. cerevisiae*. Die Zahlen am Ende jeder Komponente geben die Anzahl der Aminosäuren jedes Proteins an. Die Beschreibung der funktionellen Elemente sind der Legende zu entnehmen. Ergänzt sind die Namen der humanen Homologen aufgeführt. Modifiziert nach (Netz *et al.*, 2013).

Eine Funktion von Cfd1 und Nbp35 als Gerüstproteine bei der Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine ließ sich anhand mehrerer Beobachtungen nachweisen. Es wurde gezeigt, dass der verbrückende Fe-S Cluster nur transient an den Cfd1-Nbp35 Komplex bindet und effizient auf Apoproteine übertragen werden kann, wobei der Transfer wesentlich schneller erfolgt als die Assemblierung nach chemischer Rekonstitution (Netz *et al.*, 2007). Dies wurde kürzlich zusätzlich durch *in vivo* Studien belegt. *Pulse-Chase* Experimente mit ^{55}Fe -markierten Hefezellen demonstrierten, dass die zwei unterschiedlichen Fe-S Cluster-Typen des Cfd1-Nbp35 Komplexes unterschiedlich labil sind (Pallesen *et al.*, 2013). Für beide P-Loop NTPasen, Cfd1 und Nbp35, konnte gezeigt werden, dass das Walker A Nukleotid-Bindemotiv essentiell für die Funktion bei der Fe-S Cluster-Assemblierung ist. Mutationen innerhalb dieses Motivs sind letal für die Hefezelle, verhindern den Fe-S Cluster-Einbau in Cfd1 und Nbp35 und unterbinden als Folge dessen den gesamten Fluss der CIA-Maschinerie (Netz *et al.*, 2012a).

In einer genetischen Suche zur Identifizierung funktioneller Interaktionspartner der mitochondrialen Eisen-Importer Mrs3/4 wurde Dre2 entdeckt und als CIA-Komponente charakterisiert (Zhang *et al.*, 2008). Das Protein besteht aus einer N-terminalen S-Adenosylmethionin (SAM)-Methyltransferase-ähnlichen Domäne, die durch einen flexiblen Bereich mit dem C-Terminus verbunden ist (**Abb. 1.7**) (Soler *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2011). Dieser zeichnet sich durch zwei Motive mit je vier konservierten Cysteinresten aus (Motiv 1: $\text{CX}_n\text{CX}_2\text{CXC}$, Motiv 2: $\text{CX}_2\text{CX}_7\text{CX}_2\text{C}$). Nach chemischer Rekonstitution kann Dre2 sechs Eisen- und Sulfidionen pro Monomer binden.

EPR-spektroskopische Analysen ergaben einen Mix aus [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Clustern, die mit dem Motiv 1 und dem Motiv 2 des Proteins assoziiert sind (Netz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008). Durch Interaktionsstudien von Dre2 wurde die Diflavinreduktase Tah18 als Komplexpartner detektiert (Krogan *et al.*, 2006; Soler *et al.*, 2011; Vernis *et al.*, 2009). Dieses essentielle Protein enthält unterschiedliche Domänen zur Bindung von FMN, NAD(P)H und FAD (**Abb. 1.7**). Nach Depletion von Tah18 in Hefezellen und sich daran anschließenden Enzymaktivitätsmessungen, sowie Markierung mit ⁵⁵Fe konnte Tah18 als CIA-Faktor charakterisiert werden (Netz *et al.*, 2010). Biochemische und EPR-spektroskopische Studien haben gezeigt, dass Elektronen von NADPH über die FMN- und FAD-Domänen des Tah18 auf den [2Fe-2S]-Cluster des Dre2 übertragen werden (Netz *et al.*, 2010). Zellbiologische Experimente legten nahe, dass diese Elektronentransportkette *in vivo* nicht für die Reifung von Dre2 benötigt wird, da die Depletion von Tah18 die Effizienz der Reifung dieses Fe-S Proteins nicht beeinträchtigt. Überraschenderweise führte auch die Depletion jeder anderen CIA-Komponente nicht zu einem Maturierungsdefekt von Dre2. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass Dre2 und Tah18 für die Assemblierung des N-terminalen [4Fe-4S]-Clusters von Nbp35 benötigt werden. Da der N-terminale und der Cfd1-Nbp35 verbrückende Cluster zusammenarbeiten, ist die Elektronentransportkette aus NADPH-Tah18-Dre2 essentiell für die Funktion des Cfd1-Nbp35 Gerüstproteinkomplexes und damit für den Rest der CIA-Maschinerie (Netz *et al.*, 2012a; Netz *et al.*, 2010). Die CIA-Elektronentransportkette ist evolutionär konserviert. Die humanen Homologen von Dre2 und Tah18, sowie die Kombination der Homologen von *Arabidopsis thaliana* komplementieren den Wachstumsdefekt und den Fe-S Cluster-Synthesedefekt von Dre2- und Tah18-depletierten Hefezellen (Bernard *et al.*, 2013; Netz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008).

Neben der Fe-S Cluster-Biogenese konnte für Dre2 noch eine andere Funktion beschrieben werden. So führte die Depletion von Dre2 zu einer Beeinträchtigung der Aktivität der Ribonukleotid Reduktase (RNR), welche die Bildung von Desoxyribonukleotiden als Grundlage für die DNA-Synthese katalysiert (Zhang *et al.*, 2011). Mit dieser Abhängigkeit von Dre2 werden zwei essentielle biologische Prozesse in der eukaryotischen Zelle verknüpft, die Fe-S Proteinbiogenese und die Synthese von DNA.

Nar1 ist ein Fe-S Protein mit Sequenzhomologie zu bakteriellen [FeFe]-Hydrogenasen (Mulder *et al.*, 2011; Nicolet & Fontecilla-Camps, 2012). Alle eukaryotischen Nar1 Homologen zeichnen sich durch eine N-terminale Ferredoxin-ähnliche Domäne mit vier Cysteinen aus, die den Liganden des mittleren [4Fe-4S]-Clusters von [FeFe]-Hydrogenasen entsprechen (**Abb. 1.7**). Die C-terminale Domäne entspricht dem

aktiven Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen (Balk *et al.*, 2004). Durch physiologische und biochemische Analysen wurde bestätigt, dass Nar1 in der Hefe und der Pflanze zwei [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, wobei die Assemblierung des C-terminalen Fe-S Clusters des Nar1 in der Hefe abhängig vom N-terminalen Fe-S Cluster ist (Balk *et al.*, 2004; Cavazza *et al.*, 2008; Urzica *et al.*, 2009). Studien zur Stabilität der beiden Fe-S Cluster lassen vermuten, dass der N-terminale Cluster labil gebunden und der Oberfläche des Proteins zugewandt ist. Der C-terminale Cluster hingegen ist stabil assoziiert, was sich aus der Bindung im Inneren des Proteins leicht erklärt.

Die Depletion von Nar1 in der Hefezelle hat einen starken Einfluss auf die Reifung aller bisher untersuchten zytosolischen und nukleären Fe-S Zielproteine (Balk *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigt Nar1 Interaktionen zu anderen CIA-Komponenten auf. So konnte beobachtet werden, dass Nar1 *in vivo* mit Dre2, Tah18, Cia1 und Cia2 interagiert (Balk *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2010). Die physiologische Relevanz dieser Interaktionen wurde durch funktionelle Analysen in der Hefe untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Depletion von Cfd1, Nbp35, Dre2 und Tah18 die Reifung von Nar1 *in vivo* beeinträchtigt, aber Nar1 umgekehrt nicht für die Fe-S Cluster-Assemblierung auf Cfd1, Nbp35 und Dre2 benötigt wird (Balk *et al.*, 2004; Netz *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2010). Darüber hinaus ist die Reifung von Nar1 nicht abhängig von Cia1, Cia2 und Met18 und dieser Faktor kann daher in der Mitte der CIA-Maschinerie platziert werden, wie in **Abb. 1.6** gezeigt (Balk *et al.*, 2005; Stehling *et al.*, 2012).

Das WD40-Repeat Protein Cia1 wurde als CIA-Komponente identifiziert, nachdem gezeigt werden konnte, dass es in *Schizosaccharomyces pombe* ein Fusionsprotein mit dem CIA-Faktor Cfd1 bildet (Balk *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* wird Cia1 für die Reifung aller untersuchten Zielproteine benötigt, wohingegen es nicht an der Maturierung der CIA-Faktoren Cfd1, Nbp35, Dre2 und Nar1 beteiligt ist (Balk *et al.*, 2005; Netz *et al.*, 2010). Die Struktur von Cia1 zeigt sieben sog. Propellerblätter, die pseudorotationssymmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet sind (Srinivasan *et al.*, 2007) (**Abb. 1.7**). Diese Anordnung ist hoch konserviert in der großen Familie der WD40 Proteine, die meist als Plattform in komplexen Netzwerken fungieren und die Andockung anderer Proteine ermöglichen (Chen *et al.*, 2011; Xu & Min, 2011). Ein Arginin an Position 127 ist kritisch für die Interaktion mit Nar1 und die Mutation an dieser Stelle führt zu einem Wachstumsdefekt, sowie einer Beeinträchtigung der Funktion der CIA-Maschinerie (Srinivasan *et al.*, 2007). Cia1 interagiert zusätzlich mit den CIA-Faktoren Cia2 und Met18 unter Bildung des CIA-Targetingkomplexes, der im zweiten Schritt der Fe-S Proteinbiogenese den direkten Kontakt mit Apoproteinen und die anschließende Insertion der Fe-S Cluster in die Zielproteine ermöglicht (Collins *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2010; Krogan *et al.*, 2006). Durch zukünftige strukturelle Analysen

soll geklärt werden, wie Cia1 als mögliche Plattform mit seinen Partnern Nar1, Cia2 und Met18 interagiert und wie sich der CIA-Targetingkomplex genau zusammensetzt.

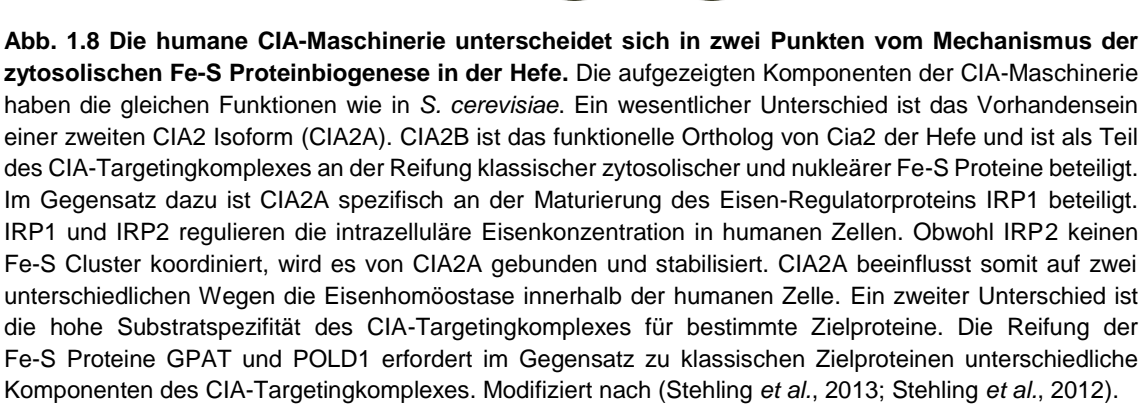
Cia2 ist ein kleines, saures Protein mit einer C-terminalen Domäne von unbekannter Funktion (DUF59 = *domain of unknown function 59*) (**Abb. 1.7**). Verschiedene systematische Interaktionsstudien in der Hefe bestätigen eine Wechselwirkung von Cia2 mit Nar1, Cia1, Met18 und dem Fe-S Protein Dna2, jedoch nicht mit den CIA-Faktoren Cfd1, Nbp35, Dre2 und Tah18 (Collins *et al.*, 2007; Gavin *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006). Cia2 wurde kürzlich als genereller Reifungsfaktor der CIA-Maschinerie charakterisiert, der einen Teil des CIA-Targetingkomplexes in der Hefe und dem humanen System bildet (Stehling *et al.*, 2013). Die Funktion von Cia2 scheint in allen Eukaryoten konserviert zu sein. Die Mutation des Cia2 Homologs AE7 in *A. thaliana* hat eine Verminderung der Aktivität der zytosolischen Aconitase und der im Zellkern lokalisierten DNA-Glycosylase zur Folge (Luo *et al.*, 2012). Durch eine systematische Analyse konnte ein hyperreaktives Cystein an Stelle 161 im Cia2 der Hefe, sowie in einem der beiden humanen Homologen (Cys93 in CIA2B) identifiziert werden (Weerapana *et al.*, 2010). Eine Mutation dieser Aminosäure ist für die Hefezelle letal und hat einen Einfluss auf die Aktivität des Fe-S Cluster-koordinierenden Enzyms Leu1.

Met18 ist das größte CIA-Protein und zeichnet sich durch mehrere *HEAT-Repeats* aus (**Abb. 1.7**). Die Deletion von Met18 in der Hefe, sowie seines humanen Homologen MMS19 im Menschen, ist mit einer Vielzahl unterschiedlichster Phänotypen verknüpft, für die lange Zeit kein kausaler Zusammenhang mit der molekularen Funktion von Met18/MMS19 erbracht werden konnte. Obwohl Hefezellen nach Deletion von Met18 lebensfähig sind, zeigen sie eine Methionin-Auxotrophie, sowie eine erhöhte Anfälligkeit für DNA-Schäden z.B. nach Bestrahlung mit UV-Licht oder Behandlung mit dem alkylierenden Agens Methylmethansulfonat (MMS) (Prakash & Prakash, 1977). Es wurde zudem gezeigt, dass Met18 als akzessorisches Protein des Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) Komplexes, der für die Transkription und die Nukleotidausschneidereparatur (NER) benötigt wird, fungiert (Lauder *et al.*, 1996). Dieser Befund kombiniert mit den Beobachtungen, dass Met18 eine Rolle bei der Regulation der Telomerlänge spielt und ein Mangel von Met18 in einer Abnahme der Fe-S Cluster-koordinierenden DNA-Helikase Rad3 resultiert, führte zu der Annahme, dass Met18 eine regulatorische Rolle bei der Nukleotidausschneidereparatur hat (Askree *et al.*, 2004; Kou *et al.*, 2008; Lauder *et al.*, 1996). Schließlich konnten all diese pleiotropen Phänotypen zwanglos mit der Fe-S Proteinbiogenesefunktion des Met18/MMS19 erklärt werden (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2012). Met18 gewährleistet die Reifung einer Vielzahl von Fe-S Proteinen, die in unterschiedlichen zellulären Vorgängen benötigt werden und bei einem Defekt in Met18 ebenso funktionell ausfallen. Eine direkte Bedeutung von Met18 für die Reifung

von Fe-S Proteinen konnte für die Sulfid Reduktase, die für die Methioninbiosynthese essentiell ist, verschiedene DNA-Helikasen, Glykosylasen und Polymerasen, die für DNA-Synthese und Reparatur nötig sind, demonstriert werden. Met18 hat vermutlich eine direkte Rolle beim Transfer der Fe-S Cluster zu unterschiedlichen Apoproteinen. Diese Hypothese wurde durch eine Interaktionsstudie gestützt, die zeigte, dass dieser CIA-Faktor vor allem im humanen System direkt mit verschiedenen Fe-S Proteinen interagiert (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2012).

1.5 Die humane CIA-Maschinerie weist zwei Besonderheiten auf

Die Komponenten der CIA-Maschinerie sind von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert (**Abb. 1.7**) (Sharma *et al.*, 2010). Es konnten bisher jedoch zwei beträchtliche Unterschiede bezüglich des zugrunde liegenden Mechanismus der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese festgestellt werden. Zum einen zeichnet sich das humane System durch eine hohe Substratspezifität des CIA-Targetingkomplexes (CIA1, CIA2B und MMS19) für bestimmte Zielproteine aus (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum gesamten CIA-Targetingkomplex in der Hefe, der für die Maturierung aller zytosolischen und nukleären Fe-S Proteine essentiell ist, hat das humane MMS19 z.B. keine Funktion bei der Reifung des im Nukleotid-Metabolismus vorkommenden Enzyms GPAT (Amidophosphoribosyltransferase) (**Abb. 1.8**). Eine andere Komponente des CIA-Targetingkomplexes, CIA2B, hingegen spielt keine wichtige Rolle bei der Maturierung der DNA-Polymerase D1 (POLD1) (Stehling *et al.*, 2013). Das bedeutet, dass die Komponenten des CIA-Targetingkomplexes im humanen System unterschiedliche Spezifitäten für die Reifung verschiedener Zielproteine besitzen. Diese Vorstellung wurde durch systematische Interaktionsstudien belegt, die zeigen, dass CIA1, CIA2B und MMS19 mit unterschiedlichen zytosolischen und nukleären Fe-S Proteinen interagieren (Gari *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2012; van Wietmarschen *et al.*, 2012). Eine solche Substratspezifität konnte bisher für die CIA-Faktoren der Hefe nicht beobachtet werden.



21

hat die CIA-Maschinerie in der Hefe keinen nachweisbaren Einfluss auf die Regulation der zellulären Eisenhomöostase (Hausmann *et al.*, 2008; Kaplan & Kaplan, 2009).

1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Viele eukaryotische Fe-S Proteine haben Funktionen in essentiellen Prozessen wie der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Proteintranslation. Zu Beginn dieser Arbeit war der Mechanismus der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese nicht vollständig aufgeklärt und es war nicht bekannt, ob der Prozess neben den bisher charakterisierten CIA-Faktoren noch weitere bisher unbekannte Komponenten erfordert.

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Zielsetzungen. Zum einen sollten durch systematische Analyse die Interaktionen der einzelnen Komponenten innerhalb der CIA-Maschinerie im Modellorganismus *S. cerevisiae* bestimmt werden. Es konnten bereits acht Proteine in der Hefe als CIA-Faktoren charakterisiert werden. Es war jedoch nicht klar, wie die einzelnen Proteine im Prozess der Fe-S Proteinreifung genau kooperieren. Durch die systematische Interaktionsanalyse sollte untersucht werden, ob sich die CIA-Faktoren in einem oder mehreren Komplexen zusammenfinden, um so die Fe-S Cluster-Assemblierung, den anschließenden Transfer und die Insertion in Apoproteine zu vermitteln.

Zum anderen sollten durch eine systematische Analyse von Interaktionspartnern bekannter CIA-Proteine potenzielle neue CIA-Faktoren oder neue Fe-S Zielproteine gefunden werden. Für potenzielle neue Fe-S Zielproteine sollten weitere Untersuchungen Aufschluss über die Rolle ihres Fe-S Kofaktors bei deren zellulärer Funktion geben.

Die Rolle potenzieller neuer CIA-Faktoren bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Zielproteine sollte mittels zellbiologischer und biochemischer Analysen genauer charakterisiert werden. Dabei sollte geklärt werden, in welcher Phase der Fe-S Proteinbiogenese diese neuen Faktoren ihre Funktion ausüben. Im Falle von möglichen spät agierenden CIA-Faktoren sollte gezielt untersucht werden, ob die bisher nur für das humane CIA-System beschriebene Substratspezifität auch in der Hefe bestätigt werden kann.

Zunächst in der Hefe durchgeführte Untersuchungen sollten schließlich auf das humane System übertragen werden, um eine Konservierung neu gefundener CIA-Faktoren zu demonstrieren. Damit sollte final geklärt werden, ob es sich bei den neuen Faktoren um hefespezifische Proteine handelt, oder aber um generelle, eukaryotische Faktoren.

2 Ergebnisse

Bisher wurden acht Komponenten der CIA-Maschinerie *in vivo* und *in vitro* durch unsere und andere Arbeitsgruppen charakterisiert und einzelne Interaktionen, sowie Teilkomplexe beschrieben (Netz *et al.*, 2013). Aufgrund bestehender Defizite im Verständnis dieser Interaktionen, sollten in der vorliegenden Arbeit durch systematische Analyse der Interaktionspartner bekannter CIA-Proteine zum einen die Wechselwirkungen der bereits bekannten CIA-Faktoren (CIA-Interaktom) näher charakterisiert werden, zum anderen sollten mögliche bisher unbekannte CIA-Faktoren oder neue Fe-S Zielproteine identifiziert werden. Um die Wechselwirkungen innerhalb des CIA-Interaktoms und Interaktionen zwischen CIA-Faktoren und Fe-S Zielproteinen aufzufinden, bediente man sich der TAP-MS Methode unter Verwendung der *S. cerevisiae* TAP-Stammkollektion von Euroscarf.

2.1 Systematische Identifizierung der Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie

Bei der hier durchgeführten Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) wurde jeweils ein CIA-Faktor (Köderprotein) durch C-terminale Fusion mit einem TAP-Tag unter Verwendung zweier verschiedener stationärer Phasen aus dem Zelllysat gereinigt (**Abb. 2.1**). Kontaminationen wurden dadurch weitestgehend entfernt und spezifische Interaktionspartner konnten durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

Die hier verwendete *S. cerevisiae* TAP-Stammkollektion wurde bereits in einer früheren Arbeit zur Aufklärung des gesamten Hefeproteoms generiert, wobei jedes Offene Leseraster mit einem C-terminalen TAP-Tag fusioniert wurde (Gavin *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2002). Unter Verwendung der heutzutage gängigen und sensitiveren Nachweisverfahren wurde die Analyse des CIA-Interaktoms neu durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die bereits bekannten CIA-Faktoren einen Superkomplex bilden, der für die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine benötigt wird, oder ob sie sich in Subkomplexen organisieren, die unterschiedliche Aufgaben in diesem Reifungsprozess haben.

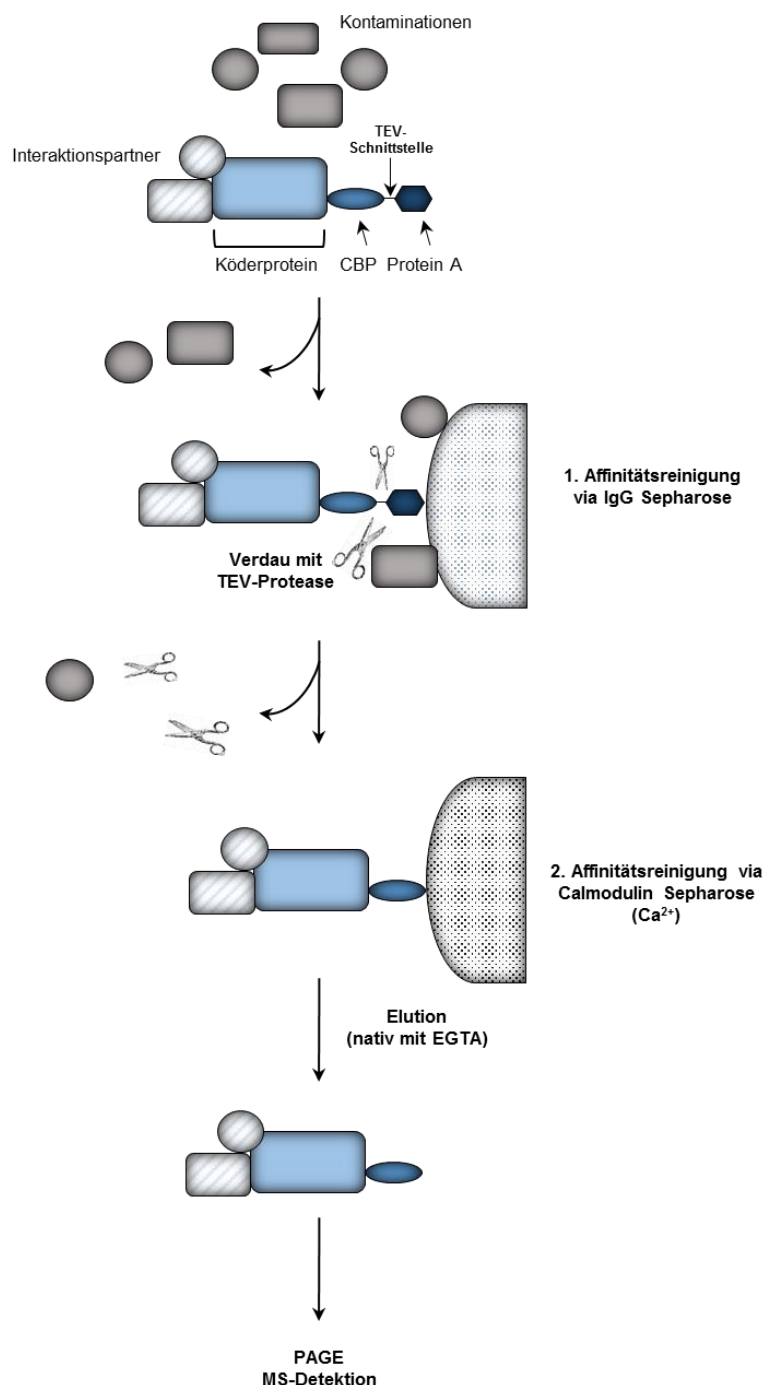


Abb. 2.1 Die Tandem-Affinitätsreinigung dient der gezielten Interaktionsanalyse zweier Proteine in *S. cerevisiae*. Dabei wird das Köderprotein C-terminal mit zwei aufeinander folgenden Protein-Tags, hier CBP (*Calmodulin Binding Peptide*) und Protein A, fusioniert. Zwischen beiden Tags befindet sich die Erkennungssequenz für die TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease (ENLYFQ'G). Im ersten Schritt der Tandem-Affinitätsreinigung (*Tandem Affinity Purification*, TAP) erfolgt die Bindung des Köderproteins an IgG-Sepharose. Dabei werden unspezifisch bindende Proteine (Kontaminationen) weitestgehend entfernt. Durch den Verdau mit der TEV-Protease wird die Elution des Köderproteins und seiner Interaktionspartner von der ersten Säule ermöglicht. Die anschließende Bindung an Calmodulin-Sepharose in Anwesenheit von Ca²⁺ dient der Entfernung der TEV-Protease und restlicher Kontaminationen. Der Komplex aus Köderprotein mit CBP-Tag und Interaktionspartnern kann

je nach weiterer Verwendung unter nicht denaturierenden Bedingungen (EGTA) oder denaturierenden Bedingungen mit einem Glycin-Puffer von der zweiten stationären Phase eluiert werden. Die Detektion von spezifischen Interaktionspartnern erfolgt mittels SDS-PAGE oder Massenspektrometrie (MS). Modifiziert nach (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

Als Grundlage für die systematische Interaktionsanalyse der CIA-Faktoren wurde zunächst die Expression der TAP-Fusionsproteine durch Immundetektion mit einem Antikörper nachgewiesen, der gegen das Calmodulin-bindende Peptid (CBP) gerichtet ist (**Abb. 2.2 B**). Dazu wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt und analysiert. In fast

allen untersuchten Stämmen führte die Fusion mit der TAP-Sequenz zu funktionellen CIA-Proteinen, was sich daraus ableiten lässt, dass außer Met18 alle CIA-Faktoren essentiell sind und die Expression der jeweiligen Fusionsproteine das Zellwachstum nicht beeinträchtigte. Mittels Immundetektion konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme von Cia2-TAP alle Fusionsproteine auf der erwarteten Höhe im Gel nachzuweisen waren (vgl. **Abb. 2.2 A**). Für den essentiellen CIA-Faktor Tah18 konnte jedoch kein TAP-Stamm generiert werden, da die C-terminale Fusion des Gens mit der TAP-Sequenz für die Zelle letal ist (Gavin *et al.*, 2002). Im Zuge dieser Arbeit wurde auf unterschiedlichen Wegen versucht, ein Tah18-TAP-Fusionsprotein zu generieren, das als Grundlage für die Tandem-Affinitätsreinigung verwendet werden konnte. Jedoch zeigte sich, dass sowohl die N-terminale Fusion mit dem TAP-Tag durch Integration ins Hefegenom, als auch die Klonierung eines Vektors zur Expression des N- oder C-terminal TAP-fusionierten Tah18 nicht zum Erfolg führten. Dabei scheint besonders der vergleichsweise große TAP-Tag eine störende Wirkung auf die Funktion von Tah18 auszuüben, denn in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Fusion mit der 3HA-Sequenz nicht letal ist (Netz *et al.*, 2010). Die systematische Analyse des CIA-Interaktoms wurde aufgrund dessen nur mit sieben der acht bekannten CIA-Proteine durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde nach jeder Tandem-Affinitätsreinigung und bevor die Probe für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet wurde, das präzipitierte Protein im finalen Eluat via Immundetektion oder durch Silberfärbung der Proteine nachgewiesen (**Abb. 2.2 C, D**). Die erfolgreiche Reinigung über IgG-, sowie Calmodulin-Sepharose konnte durch eine Verringerung der Molmassen der Fusionsproteine um 15 kDa bestätigt werden. Diese ergab sich aus der Abspaltung des äußeren Protein A-Tags nach Verdau mit TEV-Protease an der ersten Säule. Mit Ausnahme von Cfd1 konnten alle CBP-Fusionsproteine im Eluat durch Immundetektion nachgewiesen werden (**Abb. 2.2 C**). Das Nicht-Auffinden des Cfd1-CBP-Fusionsproteins nach Immundetektion könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Protein während der Proteolyse partiell abgebaut wird. Diese Beobachtung lässt sich damit vereinbaren, dass es im Zellextrakt problemlos nachgewiesen werden konnte (**Abb. 2.2 B**). Durch die Massenspektrometrie konnte, wie weiter unten gezeigt, sichergestellt werden, dass alle Köderproteine in den finalen Eluaten vorhanden waren. Ein proteolytischer Abbau ließ sich zudem für die Fusionsproteine Dre2-, Nar1- und Cia1-CBP sowohl nach Immundetektion, als auch nach Silberfärbung der Gele beobachten. Die zusätzliche Färbung der Gele mit Silbernitrat zeigte die generelle Verunreinigung auf, die sich durch unspezifische Bindung von Proteinen an beide Affinitätsmatrices ergab (**Abb. 2.2 D**). Als Kontrolle für solche generellen Kontaminationen wurde die Tandem-Affinitätsreinigung mit dem Wildtyp-Stamm

(SC0000) durchgeführt, der kein TAP-fusioniertes Protein exprimiert. Alle mit diesem Stamm in der Massenspektrometrie detektierten Proteine wurden als generelle Kontaminationen bewertet und als spezifische Interaktionspartner ausgeschlossen. Beispiele dafür sind weiter unten in dieser Arbeit aufgeführt.

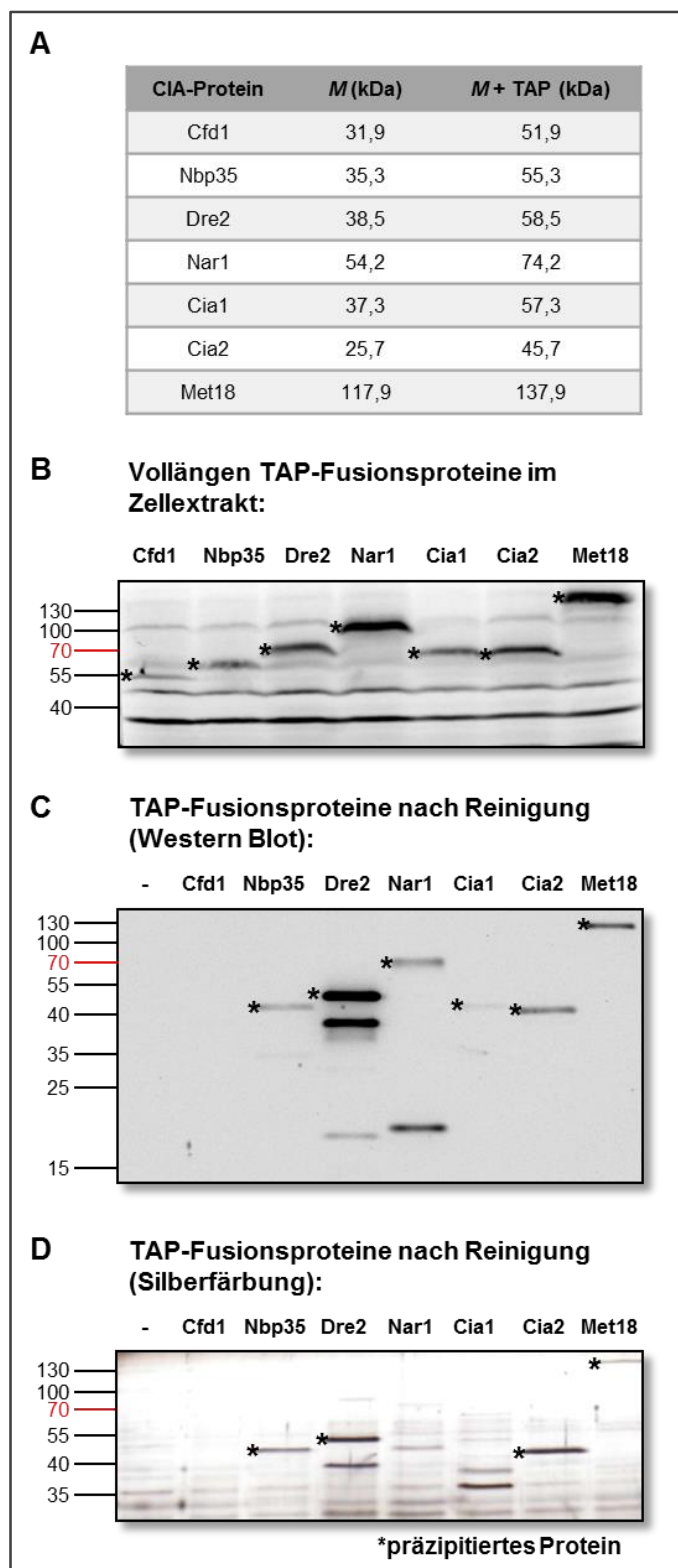


Abb. 2.2 C-terminal TAP-fusionierte CIA-Faktoren als Grundlage für die Analyse des CIA-Interaktoms.

(A) Molmassen (M) der CIA-Faktoren ohne bzw. mit C-terminalem TAP-Tag (Calmodulin bindendes Peptid-TEV-Spaltstelle-Protein A), das die Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) über IgG- und Calmodulin-Sepharose erlaubt.

(B) Für den Nachweis der Expressionsstärke der TAP-Fusionsproteine (*) wurden Hefegesamtzellextrakte der TAP-Fusionsstämme mittels alkalischer Lyse hergestellt und 20 μ l auf ein 12,5 % SDS-PAGE Gel geladen. Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem α TAP Antikörper, der gegen den CBP-Tag gerichtet ist, detektiert. (C) Nach der Tandem-Affinitätsreinigung erfolgte der Nachweis der Fusionsproteine (*) im finalen Eluat via Western Blot. 2 % des Eluates der Calmodulin-Sepharose-Säule wurden auf ein 12,5 % SDS-PAGE Gel geladen, auf Nitrocellulose übertragen und Fusionsproteine mittels α TAP Antikörper detektiert. (D) Nachweis der Fusionsproteine (*) nach erfolgter Reinigung via Silberfärbung. 6 % des Eluates der Calmodulin-Sepharose-Säule wurden auf ein 12,5 % SDS-PAGE Gel geladen und die Proteine wurden mit Silbernitrat gefärbt. Spur 1 (-) repräsentiert unspezifisch an beide Säulen bindende Proteine (Stamm SC0000).

2.1.1 Das CIA-Interaktom kann durch systematische Analyse nur partiell aufgeklärt werden

Zum Nachweis der Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie wurden die Eluate der Tandem-Affinitätschromatographie massenspektrometrisch analysiert. Die Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie und die anschließende Messung erfolgten in Kollaboration mit Dr. Jan Seebacher von der *Proteomics Core Facility* des EMBL in Heidelberg. Die bioinformatische Auswertung der TAP-MS Daten wurde von Dr. Jan Seebacher und Dr. Karl Kugler (EMBL Heidelberg) durchgeführt.

Zur Identifizierung von spezifischen Interaktionspartnern wurden die MS/MS-Spektrogramme in *MASCOT* geladen. Die *MASCOT Software* wird speziell für die Auswertung von Daten aus der Protein-Massenspektrometrie verwendet (Koenig *et al.*, 2008; Perkins *et al.*, 1999). Die Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Peptiden und Proteinen wird dabei durch eine Datenbanksuche ermöglicht. Die weitere Analyse erfolgte unter Verwendung der *ProHITS Software* (Liu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010). Mithilfe des *SAINT (Significance Analysis of Interactome)* Algorithmus wurde dann die Wahrscheinlichkeit der gefundenen Protein-Protein Interaktionen mit einem Wert charakterisiert. Dieser Algorithmus dient der unbefangenen Bewertung von *bona fide* Protein-Protein Wechselwirkungen bei gleichzeitiger Entfernung unspezifischer Interaktionen aus einem TAP-MS Datenset (Choi *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012). Durch Variation der für die Analyse verwendeten Parameter bekommt man ein Maß für die Robustheit (Wert zwischen 0 und 1) einer detektierten Interaktion. Daraus wurde ein Netzwerk von Interaktionen generiert (**Abb. 2.3**).

Die systematische Analyse der TAP-MS Daten unter Verwendung des *SAINT* Algorithmus konnte Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie nur partiell aufklären. Starke Interaktionen in **Abb. 2.3** sind durch grüne Verbindungslinien repräsentiert, und wurden für die Interaktionspaare Dre2-Tah18, Cia1-Cia2, Cia2-Nar1 und Met18-Cia2 nachgewiesen. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse früherer Studien (Collins *et al.*, 2007; Krogan *et al.*, 2006). Demgegenüber konnte der Nachweis der Interaktionen von Cfd1-Nbp35, Nar1-Cia1 und Cia1-Met18 in dieser Analyse nicht erbracht werden, obwohl es dafür bereits experimentelle Evidenz aus gezielten Untersuchungen gab, die in der Regel die Überexpression der untersuchten CIA-Proteine nutzte (Balk *et al.*, 2005; Hausmann *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2002).

Vermutlich war die fehlende Interaktion in der TAP-Analyse auf ein Detektionsproblem zurückzuführen, das sich mit den niedrigen Expressionsniveaus der meisten CIA-Faktoren erklären lässt (**Tab. 2.1**). Unter den gewählten *SAINT* Parametern können Interaktionen niedrig abundanter Proteine, sowie transiente Interaktionen offensichtlich nicht zuverlässig detektiert werden.

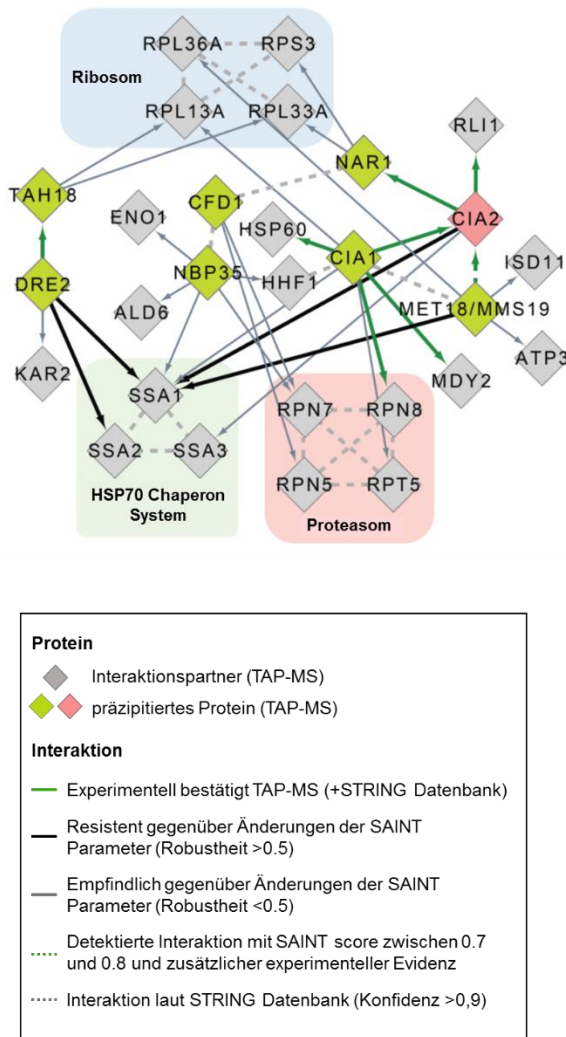


Abb. 2.3 Das CIA-Interaktom kann durch TAP-MS nur partiell aufgeklärt werden. Experimenteller Nachweis von CIA-Interaktionspartnern mittels TAP-MS (Tandem-Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie, n = 4). Proteine, die in der TAP präzipitiert wurden, sind als rote oder gelbe Rauten und deren Interaktionspartner als graue Rauten dargestellt. Verbindungslinien repräsentieren die Interaktion zweier Proteine mit unterschiedlichen Konfidenzniveaus nach systematischer Auswertung der TAP-MS Daten mit dem *SAINT* (*Significance Analysis of INteractome*) Algorithmus oder nach Überlagerung mit experimentellen Daten der *STRING* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins*) Datenbank (Choi et al., 2011; Szklarczyk et al., 2011). **Grün, dick:** Mit TAP-MS detektierte starke Interaktion, die zusätzlich durch *STRING* Daten belegt wurde. **Schwarz, dick:** starke Interaktion, resistent gegenüber Änderungen des *SAINT* Algorithmus (*SAINT score* >0,8, Robustheit >0,5). **Grau, dünn:** Interaktion mit geringerer Konfidenz, empfindlich gegenüber Änderungen der *SAINT* Parameter (*SAINT score* >0,8, Robustheit <0,5). **Grün, gestrichelt:** Interaktion mit *SAINT score* zwischen 0,7 und 0,8 und zusätzlicher experimenteller Evidenz. **Grau, gestrichelt:** Interaktion, die nur in der *STRING* Datenbank verzeichnet ist (*STRING* Konfidenz >0,9).

Tab. 2.1 CIA-Faktoren sind niedrig abundante Proteine. Die Anzahl der Moleküle pro Zelle wurde durch eine globale Protein-Analyse abgeschätzt (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Jedes offene Leseraster in *S. cerevisiae* wurde mit einem Epitop versehen und anschließend die Expression des Proteins durch Immundetektion des Tags quantifiziert (k. A. = keine Angabe).

CIA-Faktor	Moleküle / Zelle
Cfd1	k. A.
Cia1	5640
Cia2	1800
Dre2	1050
Nar1	k. A.
Nbp35	k. A.
Met18	3150
Tah18	k. A.

Im Gegensatz dazu wurden unter Verwendung des *SAINT* Algorithmus Proteine als spezifische Interaktionspartner erkannt, die wegen ihrer hohen Abundanz in den Eluaten der TAP-Reinigung detektiert werden konnten. Dabei handelte es sich vor allem um ribosomale Proteine, Komponenten des Proteasoms oder Chaperone, die aufgrund ihrer natürlichen Funktionen vielfältige Interaktionen aufzeigen. Basierend auf anderen globalen Interaktionsstudien in *S. cerevisiae* wurde eine Liste mit solchen generellen Kontaminationen erstellt, die u.a. das ribosomale Protein Rps3 mit 146.000 Kopien pro Zelle und das HSP70-Chaperon SSA1 mit 269.000 Kopien enthält (**Tab. 8.1**, Anhang). Verbindungen dieser großen Proteinkomplexe zu Komponenten der CIA-Maschinerie wurden somit als nicht spezifisch erachtet. Die in systematischen Analysen beobachtete Kontamination mit hoch abundanten Faktoren verdeutlicht die Problematik beim Nachweis niedrig abundanter Proteine, wie z.B. der CIA-Faktoren.

2.1.2 Die CIA-Maschinerie besteht aus drei Subkomplexen, die unterschiedlichen Phasen der Reifung zuzuordnen sind

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie. Durch die Verwendung der TAP-MS Methode sollte untersucht werden, ob alle bisher bekannten CIA-Faktoren einen Superkomplex bilden oder sich in kleineren Komplexen, entsprechend der jeweiligen Funktion, organisieren. Wie oben gezeigt werden konnte, führte die computerbasierte Auswertung der TAP-MS Daten nur zu einer partiellen Aufklärung des CIA-Interaktoms. Transiente Interaktionen oder Interaktionen zwischen niedrig abundanten Proteinen fielen dabei unter die Nachweisgrenze. Um auch solche Interaktionen auffinden zu können, wurde die zugrunde liegende Datenmenge zusätzlich semiquantitativ ausgewertet. Dazu wurde manuell bestimmt, wie viele CIA-spezifische Peptide pro Tandem-Affinitätsreinigung mit einem CIA-Protein ko-präzipitiert wurden (**Tab. 2.2**). In der Reinigung von Cfd1-TAP konnte kein Peptid identifiziert werden, das einem anderen CIA-Faktor zuzuordnen war.

Für die Reinigung aller anderen TAP-getaggen CIA-Faktoren ergab die massenspektrometrische Analyse wenigstens ein Peptid, das auf eine Interaktion mit einem weiteren CIA-Faktor schließen ließ. Es konnte gezeigt werden, dass nach Präzipitation von Cia1, Cia2 und Met18 jeweils drei weitere CIA-Faktoren im Eluat detektiert wurden. Offensichtlich war dabei Dre2 das einzige CIA-Protein, das auch unspezifisch an die verwendeten Affinitätsmatrices binden konnte, da ein Peptid dieses Proteins in der Kontrollreinigung identifiziert wurde. Die Ko-Präzipitation von Dre2 mit Cia1 (nur ein Peptid) wurde deshalb in dieser Analyse nicht berücksichtigt. Mit dieser zusätzlichen manuellen Analyse der Daten konnten alle erwarteten Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie verifiziert werden und zusätzlich die Interaktionen zwischen den CIA-Faktoren Nar1-Dre2, Nar1-Tah18 und Met18-Nar1 gezeigt werden.

Tab. 2.2 Aufklärung der Interaktionen zwischen einzelnen CIA-Faktoren durch Bestimmung der Anzahl identifizierter Peptide. TAP-fusionierte CIA-Faktoren wurden als Köderproteine in der Tandem-Affinitätsreinigung präzipitiert und Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert. Nachfolgend ist die Anzahl CIA-spezifischer Peptide, die nach Präzipitation jedes untersuchten CIA-Faktors massenspektrometrisch detektiert wurde, angegeben. Als Kontrolle wurde die Tandem-Affinitätsreinigung mit dem Stamm SC0000 durchgeführt, der kein TAP-fusioniertes Protein exprimiert (Median biologischer und technischer Wiederholungen der TAP-MS, n = 4).

			Anzahl identifizierter Peptide							
			präzipitiertes Protein							Kontrolle
Interaktions-partner	Systematischer Name	M (kDa)	Cfd1	Cia1	Cia2	Dre2	Met18	Nar1	Nbp35	
Cfd1	YIL003W	32	20	0	0	0	0	0	2	0
Cia1	YDR267C	37	0	13	6	0	1	0	0	0
Cia2	YHR122W	26	0	10	19	0	6	0	0	0
Dre2	YKR071C	39	0	1	0	32	0	7	0	1
Met18	YIL128W	118	0	9	13	0	45	0	0	0
Nar1	YNL240C	54	0	11	24	0	2	34	0	0
Nbp35	YGL091C	35	0	0	0	0	0	0	16	0
Tah18	YPR048W	72	0	0	0	61	0	3	0	0

Als Bestätigung der mit TAP-MS detektierten Wechselwirkungen wurden binäre Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie zusätzlich durch Ko-Immunpräzipitationsversuche analysiert. Je zwei CIA-Gene in der Hefe wurden gleichzeitig C-terminal mit der CBP-TEV-9Myc (CTM)- oder der 6HA-Sequenz fusioniert. In **Abb. 2.4** sind die für diese Analyse generierten Stämme in einer Matrix zusammengefasst. Nicht in allen Fällen führte die C-terminale Fusion der CIA-Faktoren zu funktionellen Proteinen.

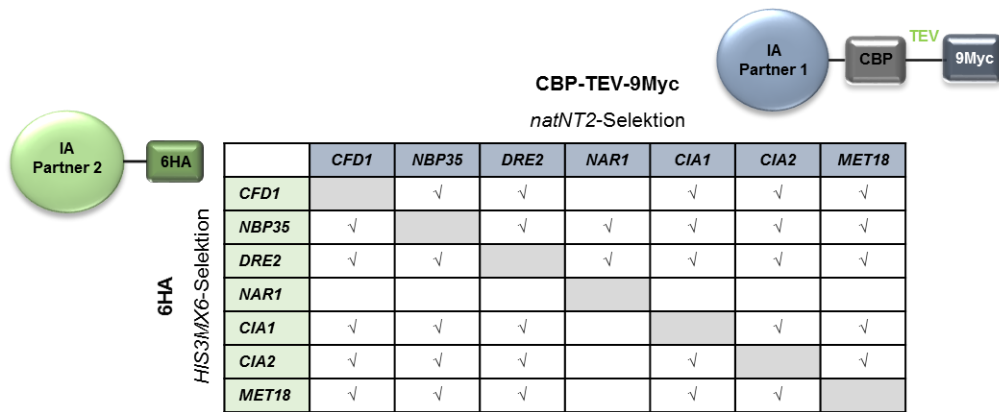


Abb. 2.4 Übersicht verfügbarer Stämme zur Analyse binärer Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie. Je zwei CIA-Gene im Wildtyp-Stamm W303a wurden zum einen mit einem C-terminalen CBP-TEV-9Myc-Tag (CTM), zum anderen mit einem C-terminalen 6HA-Tag fusioniert. Die Expression der Fusionsproteine unterlag der Kontrolle des jeweiligen endogenen Promotors. (IA = Interaktion).

Die in **Abb. 2.2 A** aufgezeigten Molmassen der CIA-Faktoren erhöhten sich durch die Fusion mit dem CTM-Tag um ca. 20 kDa, durch Fusion mit der 6HA-Sequenz um ca. 6 kDa. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Herstellung eines Gesamtzellextrakts und Immundetektion bestätigt (**Abb. 2.5 A**). Anschließend erfolgte die Ko-Immunpräzipitation zur Detektion binärer Interaktionen unter Verwendung von HA-Sepharose. Präzipitierte Proteine und ihre ko-präzipitierten Partner wurden mittels Immundetektion nachgewiesen (**Abb. 2.5 B**). Mit diesem Ansatz konnte u.a. die Interaktion zwischen Dre2 und Tah18 bestätigt werden. Dazu wurde endogenes Tah18 mit Dre2-6HA ko-präzipitiert und durch Immundetektion mit einem α Tah18 Antikörper nachgewiesen. Auch in diesem experimentellen Ansatz konnte kein funktionelles Tah18-Fusionsprotein für die Ko-Immunpräzipitation exprimiert werden. Ebenso bereitete die C-terminale Fusion von Nar1 und Nbp35 mit der CTM- oder 6HA-Sequenz Schwierigkeiten, sodass der Nachweis von Interaktionen mit diesen Faktoren hier nicht erbracht werden konnte. Bereits die Generierung der Stämme zur Expression der Nar1-Fusionsproteine scheiterte in den meisten Fällen, vermutlich weil die Fusionsproteine nicht funktionell waren (**Abb. 2.4**). Der Nachweis einer Nbp35-basierten Interaktion wurde dadurch erschwert, dass beide C-terminalen Fusionsproteine entweder nicht exprimiert wurden, oder instabil waren (**Abb. 2.5 A**). Demgegenüber konnten andere CIA-Faktoren ohne eine Beeinträchtigung ihrer Funktion mit den genannten Sequenzen fusioniert werden. Es wurde gezeigt, dass der C-terminale CTM- oder 6HA-Tag von Cia1, Cia2 und Met18 deren Stabilität und die Interaktion mit anderen CIA-Faktoren nicht beeinträchtigte. Durch die Präzipitation von Cia2-6HA und Met18-6HA konnte Cia1-CTM ko-präzipitiert werden (**Abb. 2.5 B** [*]). Mit Cia1-6HA und Met18-6HA wurde Cia2-CTM und mit Cia1- und Cia2-6HA Met18-CTM an der HA-Sepharose nachgewiesen. Aus den sechs detektierten binären Interaktionen konnte

auf einen stabilen trimeren Komplex aus Cia1, Cia2 und Met18 geschlossen werden, der ebenfalls bereits mittels TAP-MS nachgewiesen werden konnte.

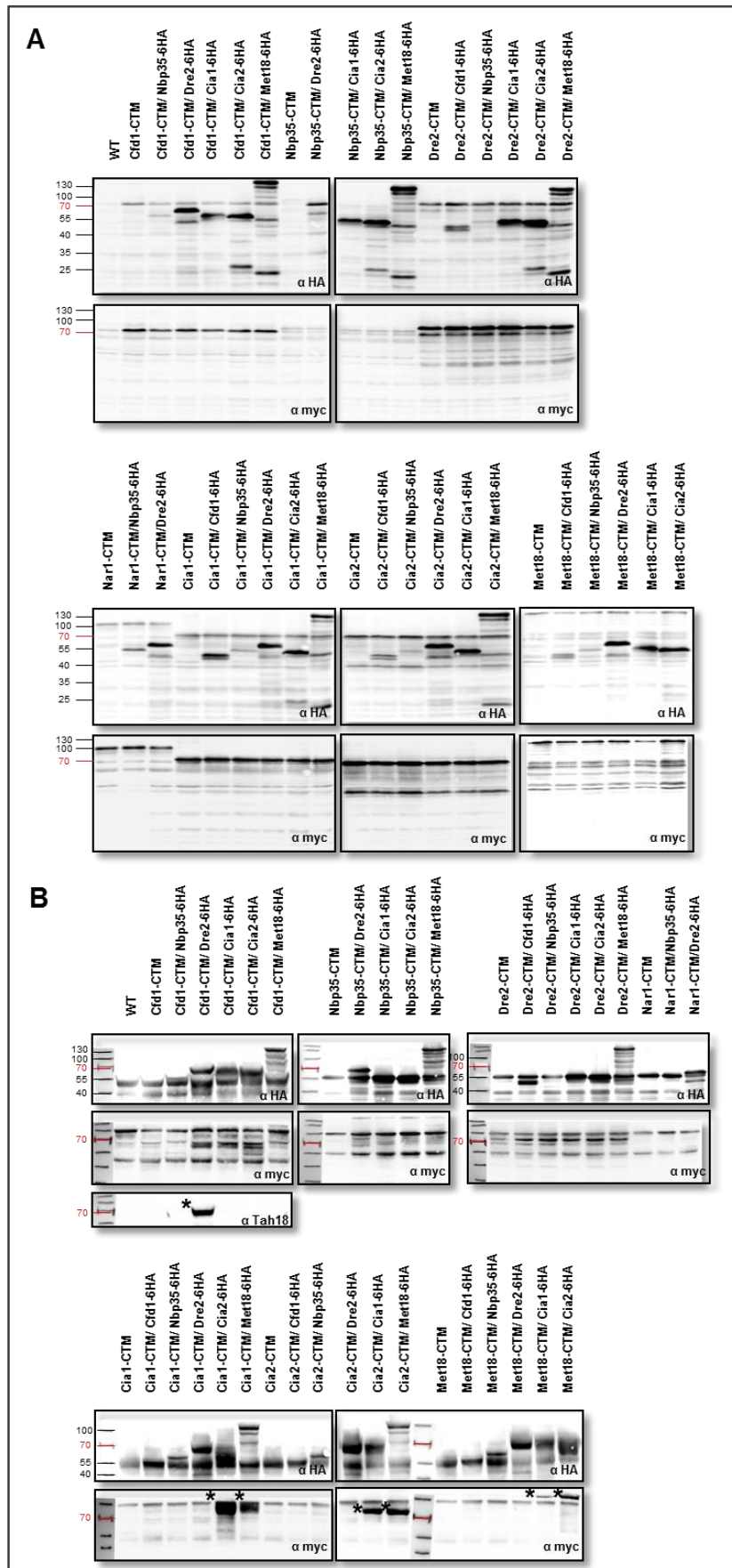


Abb. 2.5 Durch Ko-IP können die CIA-Subkomplexe Dre2-Tah18 und Cia1-Cia2-Met18 zusätzlich bestätigt werden. Nachweis binärer Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie durch Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP). In WT (W303a)-Zellen wurde durch homologe Rekombination entweder nur ein CIA-Genlokus oder zwei Genorte derart modifiziert, dass CBP-TEV-9Myc (CTM) und/oder 6HA-Fusionsproteine gleichzeitig unter Kontrolle der endogenen Promotoren exprimiert wurden. **(A)** Für den Nachweis der Expressionsstärke der Fusionsproteine wurden Zellextrakte durch mechanischen Aufschluss hergestellt. Proteine wurden TCA-präzipitiert, auf ein 12,5 % SDS-PAGE Gel geladen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Immundetektion erfolgte mit α Myc- oder α HA Antikörpern. **(B)** Für die Ko-Immunpräzipitation wurden 20 μ l HA-Sepharose mit 250 μ l Zellextrakt inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte der Sepharose mit Laemmli-Auftragspuffer denaturiert, auf ein SDS-PAGE Gel geladen und Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Interaktionspartner wurden durch Immundetektion unter Verwendung eines α Myc oder α Tah18 Antikörpers visualisiert. Mit der anderen Hälfte erfolgte der Nachweis HA-fusionierter Proteine an der Sepharose mittels α HA Antikörper. Ko-präzipitierte CIA-Faktoren wurden markiert (*).

Aus den Daten der TAP-MS-Analyse, die sowohl computergestützt als auch manuell ausgewertet wurden, und den Ko-Immunpräzipitationsdaten wurde ein neues Modell des CIA-Interaktoms gebildet (**Abb. 2.6**). Dabei ergab sich eine Aufteilung der CIA-Maschinerie in drei Subkomplexe, die sich mit den bereits bekannten Funktionen der einzelnen CIA-Faktoren bei der Fe-S Proteinbiogenese vereinbaren lässt (Balk *et al.*, 2005; Balk *et al.*, 2004; Netz *et al.*, 2007; Netz *et al.*, 2010; Stehling *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2012). Den Subkomplexen Dre2-Tah18 und Cfd1-Nbp35 wird dabei eine Rolle bei der Fe-S Cluster-Assemblierung zugeordnet. Der Subkomplex bestehend aus Cia1, Cia2 und Met18 entspricht dem CIA-Targetingkomplex, der eine Rolle beim Transfer und der Insertion des Fe-S Clusters in Zielproteine ausübt. Dieser spät agierende Komplex, der spezifisch die Interaktion mit Apoproteinen ermöglicht, wurde bereits für das humane System beschrieben (Stehling *et al.*, 2012). Mithilfe der TAP-MS Daten konnte in der Hefe erstmals die Interaktion des späten Faktors Cia2 mit dem Fe-S Zielprotein Rli1 gezeigt werden (**Abb. 2.3**). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Funktion des CIA-Targetingkomplexes konserviert ist.

Die Möglichkeit, dass sich alle CIA-Faktoren in einem einzigen Superkomplex organisieren, ist damit unwahrscheinlich. Es konnten keine stabilen Interaktionen zwischen sehr früh und sehr spät agierenden CIA-Faktoren nachgewiesen werden. Es wurde zusätzlich in dieser Arbeit gezeigt, dass Nar1 eine intermediäre Rolle in diesem Prozess einnimmt, da es sowohl mit frühen (Dre2, Tah18), als auch mit späten Faktoren der CIA-Maschinerie (Cia1, Cia2, Met18) interagiert. Die Interaktionen zwischen Nar1 und den spät agierenden CIA-Faktoren Cia1 und Cia2 waren bereits aus früheren Studien bekannt (Balk *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007).

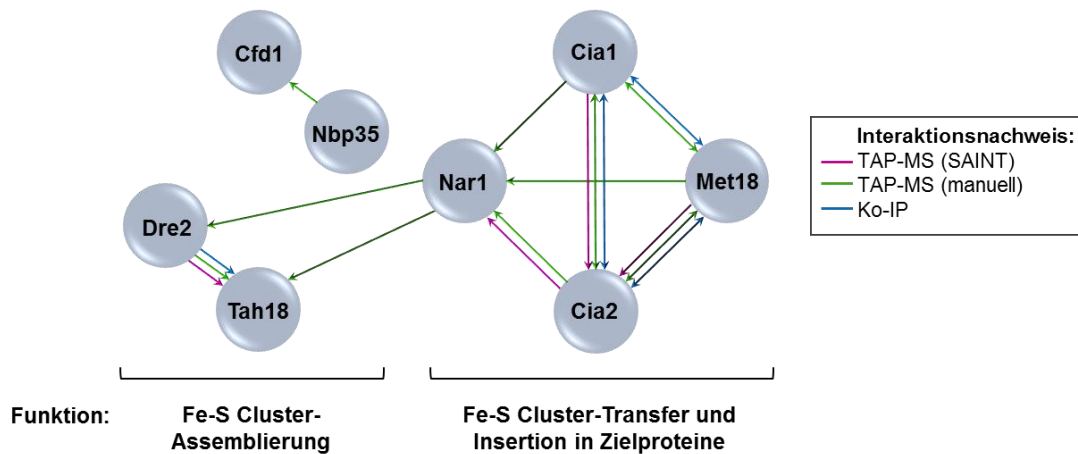


Abb. 2.6 Früh und spät agierende Subkomplexe innerhalb der CIA-Maschinerie übernehmen unterschiedliche Funktionen bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine. Interaktionen von CIA-Proteinen mit ihren Komplexpartnern wurden durch Tandem-Affinitätsreinigung und anschließende Massenspektrometrie (TAP-MS, $n = 4$) oder durch Ko-Immunpräzipitation detektiert. Pfeilspitzen geben den ko-präzipitierten Interaktionspartner des mit einem Affinitätsmarker versehenen Proteins an. Verbindungslinien repräsentieren die unterschiedlichen Nachweisverfahren der Interaktionen. Pink: Detektion mittels TAP-MS unter Verwendung des SAINT Algorithmus, Grün: Detektion mittels TAP-MS durch manuelle Identifizierung einzelner Peptide, Blau: Ko-Immunpräzipitation C-terminal fusionierter Proteine. Die spezifischen Funktionen der unterschiedlichen Subkomplexe bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine ist unter den Klammern benannt.

2.1.3 Die Depletion eines Komplexpartners verringert die Stabilität des restlichen CIA-Subkomplexes

Häufig werden Komplexpartner nach Verlust des anderen Komplexbestandteils destabilisiert und abgebaut. Deshalb sollte der Einfluss der Depletion eines CIA-Komplexbestandteils auf die Stabilität des jeweiligen Partners untersucht werden. Dazu wurden regulierbare Hefestämme verwendet, in denen der endogene Promotor eines jeden CIA-Gens durch einen *GALL*- oder *GAL1-10*-Promotor ausgetauscht wurde. Durch die Kultivierung auf Glucose-haltigem Medium für 40 oder 64 h wurde die Expression des jeweiligen Gens reprimiert. Anschließend wurde die Menge der anderen CIA-Proteine im Gesamtzellextrakt durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (**Abb. 2.7**). Die Menge einzelner CIA-Proteine wurde mit der in Wildtyp-Zellen verglichen. Unter diesen Bedingungen konnte das niedrig abundante Cfd1 mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper nicht detektiert werden.

Bei Depletion der frühen Faktoren Dre2 und Tah18 konnte eine Abnahme der Proteinmenge von Nbp35 festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf den erhöhten Abbau von Nbp35 als Folge fehlender Fe-S Cluster-Bildung am N-Terminus zurückzuführen. Ebenso beeinträchtigte die Depletion von Tah18 die Proteinmenge seines Komplexpartners Dre2. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion von Dre2 keinen Einfluss auf Tah18. Für Nar1 konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge stark von allen vier frühen Faktoren Cfd1, Nbp35, Dre2 und Tah18 abhängig war. Eine ähnliche

Abhängigkeit der Partner voneinander ließ sich für den späten Subkomplex aus Cia1, Cia2 und Met18 zeigen. Während Cia1 als sehr stabile Komponente unter allen Depletionsbedingungen nachgewiesen werden konnte, führte die Depletion desselben Faktors zu einer Destabilisierung von Cia2. Diese ließ sich auch nach Depletion von Met18 zeigen. Die Proteinmenge von Met18 hingegen wurde nur nach Depletion von Cia2 beeinträchtigt. In **Abb. 2.8** sind diese Abhängigkeiten der einzelnen Faktoren voneinander in einem Modell zusammengefasst.

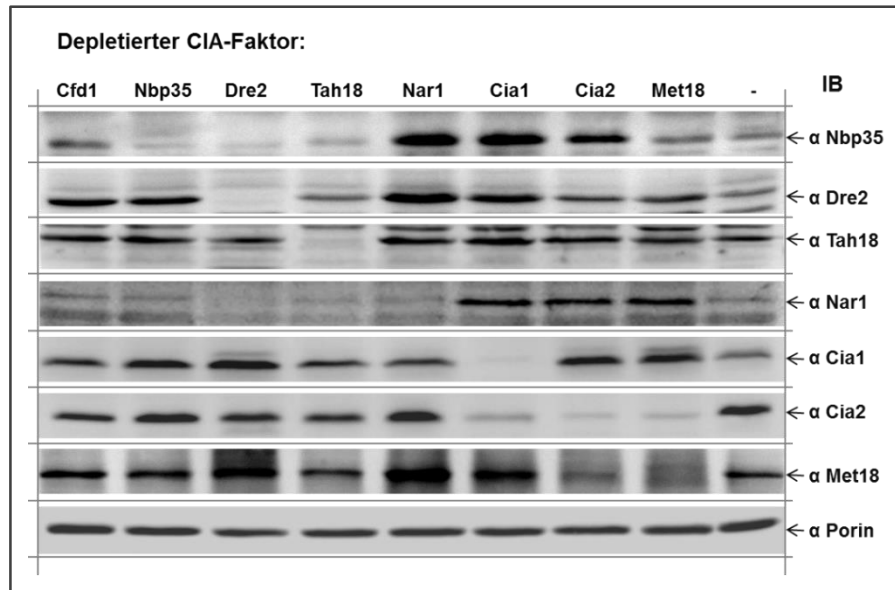


Abb. 2.7 Die Menge eines CIA-Subkomplexbestandteils ist abhängig von der Anwesenheit des entsprechenden Komplexpartners. Gal-CFD1-, Gal-NBP35-, Gal-DRE2-, Gal-TAH18-, Gal-NAR1-, Gal-CIA1-, Gal-CIA2-, Gal-MET18- und Wildtyp (W303a)-Zellen (-) wurden 40 h (Dre2-Mutante) oder 64 h (alle übrigen Mutanten) unter Depletionsbedingungen (SC-Medium mit Glucose) kultiviert. Zellextrakte wurden mittels alkalischer Lyse hergestellt, Proteine mit TCA gefällt und durch 12,5 % SDS-PAGE voneinander getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Immundetektion (IB = Immunoblot) unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die einzelnen CIA-Proteine gerichtet sind. Cfd1 war unter diesen Bedingungen nicht detektierbar. Der Nachweis von Porin diente als Ladekontrolle.

In diesem Teil der Arbeit konnten durch die computergestützte und manuelle Analyse der TAP-MS Daten sowie durch Ko-Immunpräzipitationsversuche die Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie genauer charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass die einzelnen Faktoren drei Subkomplexen zugeordnet werden können, die sequentiell die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Zielproteine bewerkstelligen. Durch ein CIA-Protein-Depletionsexperiment konnte gezeigt werden, dass die Komponenten der einzelnen Subkomplexe sich gegenseitig stabilisieren. Überdies kann die Depletion eines CIA-Faktors zum Teil auch einen destabilisierenden Effekt auf einen der später agierenden Subkomplexbestandteile zur Folge haben (**Abb. 2.8**). Dies ist im Falle der Depletion von Dre2, Tah18 sowie Cfd1 und Nbp35 durch die nicht mehr mögliche

Fe-S Cluster-Bildung auf Nbp35 und Nar1 zu erklären. Insgesamt stützen die erhaltenen Daten das bisherige Modell zum sequentiellen Ablauf der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese (**Abb. 1.6**).

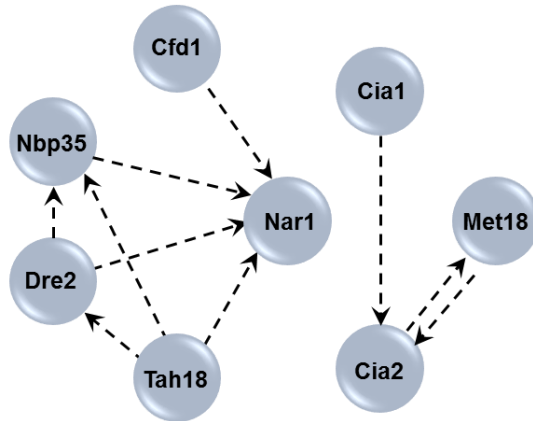


Abb. 2.8 Die Depletion eines CIA-Faktors kann die Proteinmenge anderer CIA-Komponenten verringern. Mithilfe eines CIA-Protein-Depletionsexperimentes konnte die Stabilität der anderen CIA-Faktoren verfolgt werden. Ein Einfluss des depletierten Faktors (Pfeilende) auf die Proteinmenge anderer CIA-Faktoren (Pfeilspitze) ist mit einer gebrochenen Linie gekennzeichnet.

2.2 Identifizierung und Charakterisierung zweier neuer CIA-Interaktionspartner

Im zweiten Teil der Arbeit sollten weitere, bisher nicht bekannte, CIA-Interaktionspartner spezifisch auf eine mögliche Funktion bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine hin untersucht werden.

Wie bereits erwähnt, identifizierte man in der systematischen Analyse bevorzugt hoch abundante Proteine, deren spezifische Interaktion mit den CIA-Faktoren fraglich ist, z.B. ribosomale Proteine, Chaperone und Komponenten des Proteasoms (vgl. **Abb. 2.3**). Neun weitere vermeintliche Interaktionspartner, die aus diesen Daten hervorgingen, sind nachfolgend aufgeführt (**Tab. 2.3**).

Tab. 2.3 Beschreibung der Interaktionspartner der CIA-Maschinerie. CIA-Interaktionspartner wurden mittels TAP-MS und anschließender Analyse der Daten unter Verwendung des *SAINT* Algorithmus detektiert ($n = 4$). Hoch abundante Proteine, die basierend auf früheren Studien als allgemeine Kontaminationen angesehen werden, sind markiert [*] (Gavin *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006).

Interaktions-partner	Lokalisation	Beschreibung / Funktion	Moleküle / Zelle (Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003)
Ald6	Zytosol, Mitochondrien	Zytosolische Aldehyd Dehydrogenase. Katalysiert die Umwandlung von Acetaldehyd in Acetat.	135000
Atp3	Mitochondrien	Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase.	28100
Eno1*	Zytosol, Mitochondrien	Enolase 1 (Phosphopyruvat Hydratase). Katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat während der Glykolyse.	76700
Hhf1*	Nukleosom	Histon H4. Essentiell für Chromatin-Assemblierung und Funktion von Chromosomen.	524000
Hsp60*	Mitochondrien	Chaperon zur ATP-abhängigen Faltung von Polypeptiden und Komplexbildung. Vermittelt Proteinfaltung nach Hitzeschock.	Keine Angabe
Isd11	Mitochondrien	Teil der ISC-Maschinerie. Aktiviert die Cystein Desulfurase Nfs1.	2440
Kar2*	ER	ATPase. Vermittelt Protein-Import ins ER und fungiert als Chaperon für die Proteinfaltung.	337000
Rli1	Kern, Zytosol	Essentielles Fe-S Protein: Ribosomenbiogenese, Translationsinitiation und Termination.	6280
Mdy2	Kern, Zytosol	Insertion von Proteinen in die ER-Membran. Assoziiert mit Ribosomen.	6510

Diese Liste von Interaktionspartnern war erneut mit hoch abundanten Proteinen angereichert, die z.T. bereits als generelle Kontaminationen von Tandem-Affinitätsreinigungen charakterisiert wurden. Die einzige funktionell wichtig erscheinende Interaktion, die in dieser computerbasierten Analyse aufgefunden wurde, war die von Cia2 mit dem Fe-S Protein Rli1. Transiente Interaktionen oder Interaktionen zwischen niedrig abundanten Proteinen können mit diesem Verfahren nur unzureichend detektiert werden. Zum Nachweis neuer CIA-Interaktionspartner, musste die Datenmenge deshalb auch hier zusätzlich manuell ausgewertet werden. Dazu wurden zunächst Daten der *STRING* Datenbank (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins*) in das experimentell generierte Netzwerk integriert (Szklarczyk *et al.*, 2011; von Mering *et al.*, 2003) (**Abb. 2.9**). Für die Erweiterung der Interaktionsdaten wurden Proteine, die in *STRING* als Interaktionspartner der hier verwendeten *getaggtten* Proteine und deren Komplexpartner annotiert waren, in das bestehende Netzwerk eingefügt. Anschließend wurden die Proteine semi-automatisch zu Clustern zusammengeführt und diese mittels einer *Gene Ontology*-Analyse (GO) funktionell beschrieben. Neben den bereits in **Abb. 2.3** dargestellten Clustern wurden acht weitere Proteincluster beschrieben (**Tab. 8.2**, Anhang). Mithilfe dieses erweiterten Interaktoms wurden die Daten nun manuell nach vermeintlich neuen CIA-Faktoren oder Fe-S Proteinen durchsucht. Es war wahrscheinlich, dass solche Faktoren im Zytosol oder Nukleus lokalisiert sind und bisher noch keine beschriebene Funktion haben.

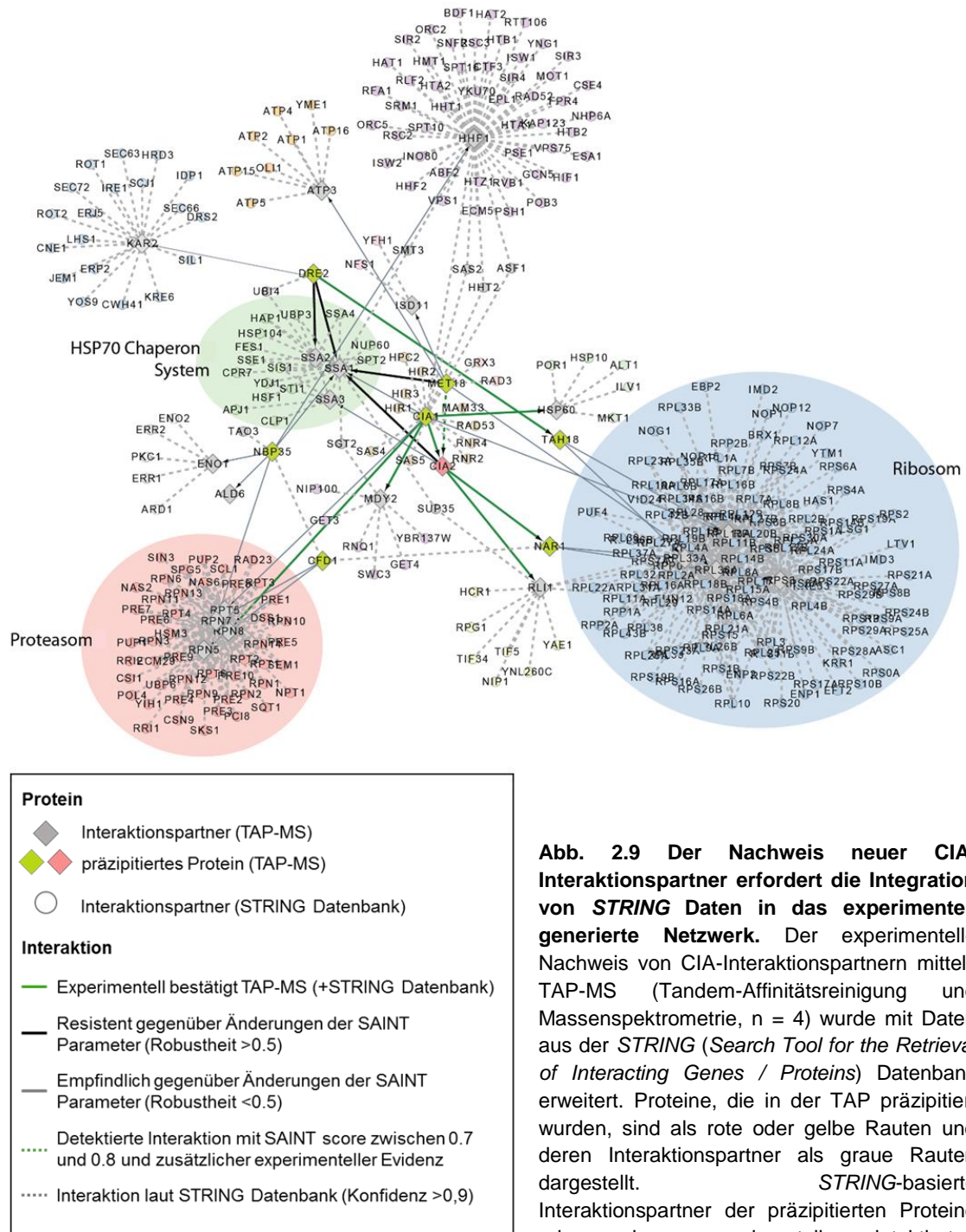


Abb. 2.9 Der Nachweis neuer CIA-Interaktionspartner erfordert die Integration von *STRING* Daten in das experimentell generierte Netzwerk. Der experimentelle Nachweis von CIA-Interaktionspartnern mittels TAP-MS (Tandem-Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie, $n = 4$) wurde mit Daten aus der *STRING* (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes / Proteins) Datenbank erweitert. Proteine, die in der TAP präzipitiert wurden, sind als rote oder gelbe Rauten und deren Interaktionspartner als graue Rauten dargestellt. *STRING*-basierte Interaktionspartner der präzipitierten Proteine oder der experimentell detektierten

Interaktionspartner sind als Kreise verzeichnet (*STRING* Konfidenz >0.9). Verbindungslinien repräsentieren die Interaktion zweier Proteine mit unterschiedlichen Konfidenzniveaus nach wahrscheinlichkeitstheoretischer Auswertung der TAP-MS Daten mit dem *SAINT* (Significance Analysis of *IN*teractome) Algorithmus oder Überlagerung mit experimentellen Daten der *STRING* Datenbank (Choi *et al.*, 2011; Szklarczyk *et al.*, 2011). **Grün, dick:** Mit TAP-MS detektierte starke Interaktion, die zusätzlich durch *STRING* Daten belegt wurde. **Schwarz, dick:** starke Interaktion, resistent gegenüber Änderungen des *SAINT* Algorithmus (*SAINT* score >0.8, Robustheit >0.5). **Grau, dünn:** Interaktion mit geringerer Konfidenz, empfindlich gegenüber Änderungen der *SAINT* Parameter (*SAINT* score >0.8, Robustheit <0.5). **Grün, gestrichelt:** Interaktion mit *SAINT* score zwischen 0.7 und 0.8 und zusätzlicher experimenteller Evidenz. **Grau, gestrichelt:** Interaktion, die nur in der *STRING* Datenbank verzeichnet ist (*STRING* Konfidenz >0.9). Alle Knoten wurden semi-automatisch zu Proteinclustern zusammengefasst und eine GO (Gene Ontology)-Analyse der resultierenden Cluster durchgeführt.

Aus der Überlagerung der experimentell generierten Daten mit Annotationen der *STRING* Datenbank konnten zwei interessante Kandidaten bestimmt werden. Diese beiden essentiellen Proteine, Yae1 und Lto1, wurden bereits in einer früheren Studie als Komplexpartner des Fe-S Proteins Rli1 beschrieben (Krogan *et al.*, 2006). Peptide dieser Faktoren konnte man nun auch manuell in der TAP-MS Datenmenge nachweisen. Aufgrund ihres geringen Expressionsniveaus wurden diese Interaktionspartner nicht nach computerbasierter Analyse der Daten detektiert (Yae1: 1500 Moleküle / Zelle, Lto1: 784 Moleküle / Zelle). Nach der Tandem-Affinitätsreinigung und manueller Auswertung der massenspektrometrischen Daten konnte eine spezifische Ko-Präzipitation mit den Komponenten des CIA-Targetingkomplexes, bestehend aus Cia1, Cia2 und Met18, gezeigt werden (**Tab. 2.4**). Der CIA-Targetingkomplex vermittelt den Transfer und die Insertion des Fe-S Clusters in Apoproteine. Diese Funktion wurde nach manueller Analyse der Daten zusätzlich durch die nun nachweisbare Interaktion von Cia1, Cia2 und Met18 mit dem Fe-S Protein Rli1 bekräftigt. Die gleichzeitige Interaktion der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex und dem Fe-S Protein Rli1 lässt vermuten, dass diese Interaktionen von physiologischer Relevanz sind.

Tab. 2.4 Detektion zweier neuer CIA-Interaktionspartner durch Bestimmung der Anzahl identifizierter Peptide TAP-fusionierte CIA-Faktoren und Lto1-TAP wurden als Köderproteine in der Tandem-Affinitätsreinigung präzipitiert und Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie identifiziert. Nachfolgend ist die Anzahl der Lto1-, Yae1- und Rli1-spezifischen Peptide, die massenspektrometrisch nach jeder Reinigung detektiert wurde, angegeben. Als Kontrolle wurde die Tandem-Affinitätsreinigung mit dem Stamm SC0000 durchgeführt, der kein TAP-fusioniertes Protein exprimiert (Median biologischer und technischer Wiederholungen der TAP-MS, n = 4). Yae1-TAP wurde nicht in die Untersuchung aufgenommen, da kein Stamm zur Expression des Fusionsproteins generiert werden konnte.

Interaktions-partner	Systematischer Name	M (kDa)	Anzahl identifizierter Peptide								
			präzipitiertes Protein								Kontrolle
			Cfd1	Cia1	Cia2	Dre2	Met18	Nar1	Nbp35	Lto1	
Lto1	YNL260C	23	0	5	7	0	4	0	0	10	0
Yae1	YJR067C	16	0	3	3	0	0	0	0	11	0
Rli1	YDR091C	68	0	16	19	0	3	0	0	6	0

2.2.1 Yae1 und Lto1: neue CIA-Faktoren oder Fe-S Zielproteine?

Der Nachweis der Interaktionen von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex brachte zwei Hypothesen zur physiologischen Bedeutung dieser Wechselwirkungen auf. Zum einen war denkbar, dass diese beiden Proteine Fe-S Zielproteine sind, die für ihre Reifung auf die Interaktion mit der CIA-Maschinerie angewiesen sind. Zum anderen

konnte es sein, dass es sich bei den beiden Faktoren um bisher nicht charakterisierte CIA-Faktoren handelte.

Ein Vergleich der Hefesequenzen von Yae1 und Lto1 mit weiteren Mitgliedern der Yae1-Proteinfamilie (pfam09811) zeigte die Anwesenheit einer konservierten Glycin-reichen Domäne auf, deren Funktion bisher unbekannt ist (**Abb. 2.10**). Dabei sind zehn Glycinreste durch je drei Aminosäuren voneinander getrennt. Ein ähnliches Motiv wurde bereits für das bakterielle Protein FliH berichtet (Trost & Moore, 2009). FliH hat eine Funktion beim Export der Komponenten des bakteriellen Flagellums. Glycin-reiche Domänen findet man überdies im Typ III-Sekretionssystem Gram-negativer pathogener Bakterien. YscL, AscL und PscL sind Homologe des FliH mit hoher Konservierung dieser deka-GX₃-Domäne.

Diese Konservierung lässt auf eine wichtige strukturegebende oder biologische Funktion schließen.

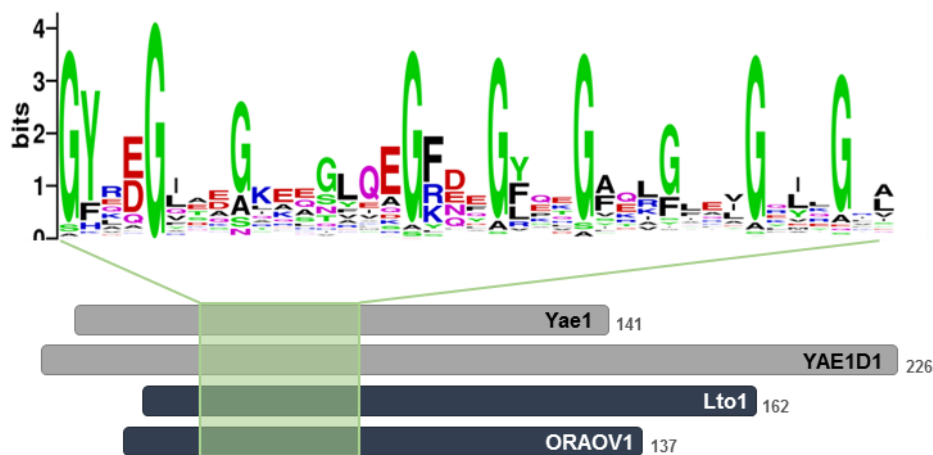


Abb. 2.10 Die deka-GX₃-Domäne von Yae1 und Lto1 ist ein konserviertes Strukturmotiv, das auch in den humanen Homologen zu finden ist. Zur Darstellung der konservierten Domäne wurde ein Multisequenzvergleich der Proteinfamilie pfam09811 durchgeführt und ein Weblogo (Weblogo.berkeley.edu) erstellt (Crooks *et al.*, 2004). Die Lage der Glycin-reichen Domäne innerhalb der *S. cerevisiae* Proteine Yae1 und Lto1 und innerhalb der humanen Homologen YAE1D1 und ORAOV1 ist grün markiert. Die Anzahl der Aminosäuren der verglichenen Proteine ist vermerkt.

Die erste Hypothese, dass die beiden Faktoren Yae1 und Lto1 Fe-S Proteine sein könnten, wurde aufgrund der Sequenzen verworfen. In beiden Proteinen findet man nicht die für die Koordination von Fe-S Clustern typischen Cystein-Motive.

Im folgenden Abschnitt sollte daher geklärt werden, ob diese beiden Faktoren neben der bereits charakterisierten CIA-Maschinerie eine Rolle bei der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine spielen. Ein Hinweis, dass es sich bei Yae1 und Lto1 um neue CIA-Faktoren handeln könnte, kam aus einer Interaktionsstudie, die im Jahr 2006 veröffentlicht wurde (Krogan *et al.*, 2006). Hier wurde erstmals gezeigt, dass beide Proteine sowohl miteinander, als auch mit dem Fe-S Protein Rli1 interagieren. Die

Verbindung zur CIA-Maschinerie konnte mit den damaligen Nachweisverfahren allerdings noch nicht erbracht werden. Während der Anfertigung meiner Arbeit wurde zusätzlich die physiologische Relevanz der Interaktionen von Yae1 und Lto1 mit Rli1 durch eine funktionelle Analyse von Lto1 und seinem humanen Homolog ORAOV1 in Teilen aufgeklärt (Zhai *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Lto1 zu Defekten bei der Reifung der großen ribosomalen Untereinheit führt, was auch zur Namensgebung des Proteins führte (*required for biogenesis of the Large ribosomal subunit and Translation initiation in Oxygen*). Aufgrund seiner Essentialität unter aeroben, nicht aber unter anaeroben Bedingungen wurde vermutet, dass Lto1 direkt mit den empfindlichen Fe-S Clustern des Rli1 interagiert und sie vor oxidativem Stress schützt (Giaever *et al.*, 2002; Snoek & Steensma, 2006). Damit wiederum könnte die Überexpression des humanen Homologs in Tumoren erklärt werden, da reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in vielen Tumoren erhöht sind. Die Überexpression von ORAOV1 könnte die Fe-S Cluster des Rli1 schützen und damit einer ROS-induzierten Schädigung des Ribosoms entgegenwirken.

Die in meiner Arbeit erbrachte Verbindung zur CIA-Maschinerie ließ hingegen vermuten, dass Lto1 noch weitere Funktionen haben könnte. Es sollte daher geklärt werden, ob die Interaktion von Yae1 und Lto1 mit der CIA-Maschinerie von physiologischer Relevanz ist und ob diese beiden Faktoren für die Maturierung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine, wie z. B. Rli1, essentiell sind.

2.2.2 Die Interaktion von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex wird durch Depletion von Nbp35 verstärkt

Die in der systematischen Analyse des CIA-Interaktoms aufgefundene Interaktion von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex sollte zunächst durch Ko-Immunpräzipitationsversuche bestätigt werden. Zum Nachweis dieser Interaktionen wurden Wildtyp-Zellen mit verschiedenen Plasmiden zur Expression von Yae1- und Lto1-Fusionsproteinen transformiert, die eine anschließende Präzipitation aus dem Gesamtzellextrakt unter Verwendung von HA-Sepharose erlaubten. Der Nachweis ko-präzipitierter Proteine, wie die des CIA-Targetingkomplexes, erfolgte durch Verwendung spezifischer Antikörper (**Abb. 2.11**). Die Ko-Immunpräzipitation von Yae1 und Lto1 konnte unter diesen Versuchsbedingungen sowohl im Wildtyp, als auch in Nbp35-depletierten Zellen, leicht nachgewiesen werden. Der Nachweis der Interaktion beider Faktoren mit dem CIA-Targetingkomplex im Wildtyp war jedoch nur nach Präzipitation von HA-Lto1 bei gleichzeitiger Überexpression von Yae1-Myc möglich. Hier konnte gezeigt werden, dass die Signale für Cia1, Cia2 und Met18 über dem Hintergrundsignal der unspezifisch an die HA-Sepharose bindenden Proteine lagen.

Vermutlich handelt es sich bei diesen Wechselwirkungen um transiente Interaktionen, die daher schwer nachweisbar sind.

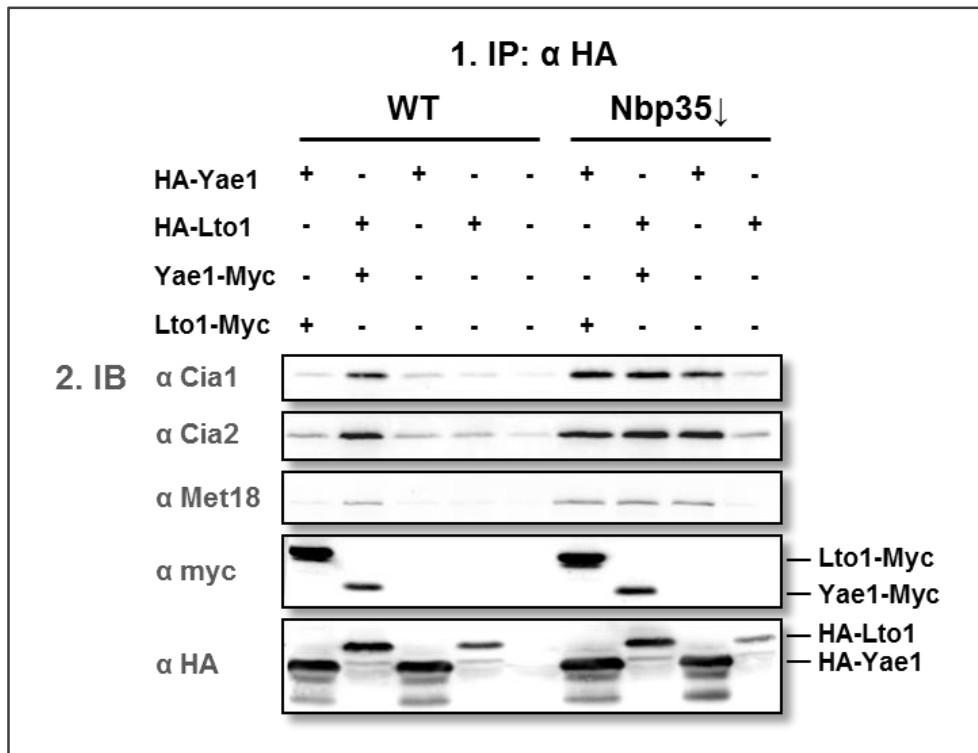


Abb. 2.11 Die Depletion des frühen CIA-Faktors Nbp35 stabilisiert die Komplexe aus Yae1 und Lto1 mit den späten CIA-Proteinen. WT (W303a)- und Gal-NBP35-Zellen wurden mit Vektoren zur Überexpression von Yae1- und Lto1-Fusionsproteinen mit N- oder C-terminalem Myc- oder HA-Tag transformiert. Die Kultivierung erfolgte für 40 h auf Minimalmedium mit Glucose, um endogenes Nbp35 zu depletieren. Anschließend erfolgten der Zellaufschluss in TAP-Lysepuffer mithilfe von Glasperlen und die Immunpräzipitation (IP) unter Verwendung von HA-Sepharose. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die sich daran anschließende Immundetektion (IB) (ko-)präzipitierter Proteine erfolgte unter Verwendung von αMyc- und αHA-Antikörpern oder Antikörpern, die spezifisch gegen die einzelnen CIA-Faktoren gerichtet sind.

Aus dem Interaktionsprofil der beiden Proteine Yae1 und Lto1 leitete sich die Hypothese ab, dass es sich bei beiden Faktoren um spät agierende CIA-Komponenten handeln könnte. Wie bereits in **Abb. 2.7** und **2.8** gezeigt, kann die Depletion eines CIA-Faktors die Stabilität anderer CIA-Proteine oder weiterer Subkomplexe beeinflussen. Die Depletion des frühen Faktors Nbp35 hatte jedoch keinen destabilisierenden Effekt auf die späten Faktoren Cia1, Cia2 und Met18. Daher wurde vermutet, dass die Depletion dieses frühen Faktors den generellen Fluss der Fe-S Cluster-Biogenese unterbinden könnte und gleichzeitig zu einer Stabilisierung des Komplexes aus Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex führen könnte. Diese Hypothese wurde durch Ko-Immunpräzipitationsdaten bekräftigt. Wie in **Abb. 2.11** gezeigt, führte die Depletion von Nbp35 tatsächlich zu einem stabileren Komplex aus HA-Yae1 und den späten CIA-Faktoren Cia1, Cia2 und Met18. Der Nachweis einer Interaktion von

HA-fusioniertem Lto1 und dem CIA-Targetingkomplex war jedoch nur bei gleichzeitiger Überexpression von Yae1-Myc möglich. Dies könnte einen Hinweis auf die Interaktionsstellen der jeweiligen Proteine geben. Womöglich stört die N-terminale Fusion mit dem HA-Tag die Interaktion mit den CIA-Faktoren, oder die Interaktion wird über Yae1 vermittelt. Ein solcher Effekt wurde bereits für den Komplex aus Lto1 und Rli1 beschrieben, auch hier soll Yae1 eine Mediatorfunktion haben (Zhai *et al.*, 2013). Dies würde erklären, warum das HA-Lto1-Fusionsprotein nur nach gleichzeitiger Überexpression von Yae1-Myc den CIA-Targetingkomplex ko-präzipitieren konnte.

Zusammenfassend konnten durch die systematische Analyse des CIA-Interaktoms und sich daran anschließender Ko-Immunpräzipitationsversuche die zwei neuen Faktoren Yae1 und Lto1 entdeckt und im CIA-Netzwerk platziert werden (**Abb. 2.12**). Es wurde gezeigt, dass beide Faktoren mit dem CIA-Targetingkomplex bestehend aus Cia1, Cia2 und Met18 interagieren. Dieser oligomere Komplex kann durch Depletion des frühen CIA-Faktors Nbp35 stabilisiert werden. Die gleichzeitige Interaktion dieser Faktoren mit der CIA-Maschinerie und dem Fe-S Protein Rli1 machen eine Funktion beider Proteine bei der Reifung von Rli1 und vermeintlich weiterer Fe-S Proteine wahrscheinlich.

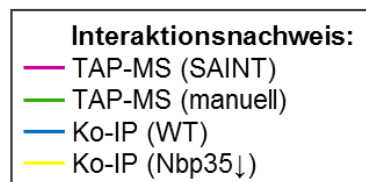
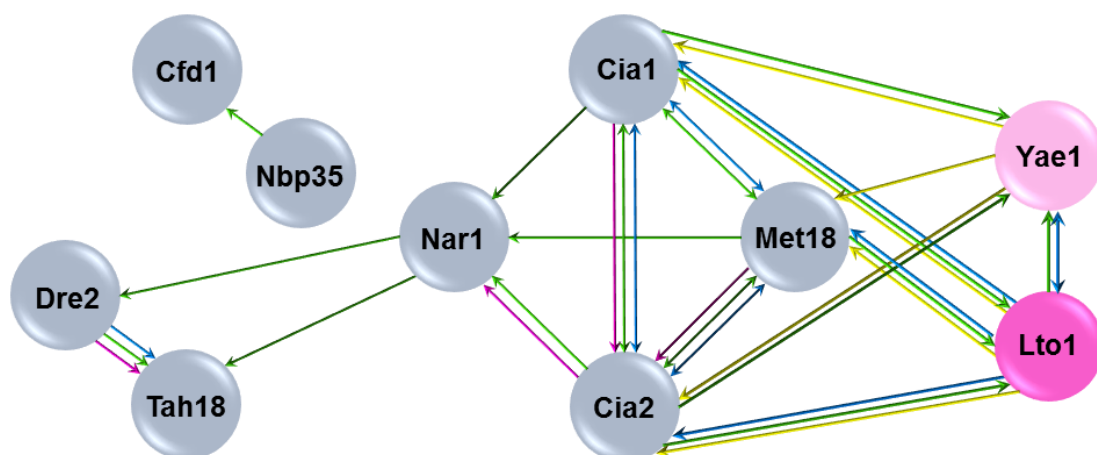


Abb. 2.12 Yae1 und Lto1 interagieren mit dem CIA-Targetingkomplex. Die Grafik basiert auf Abb. 2.6. Zusätzlich zu den dort zusammengefassten Ergebnissen wurde das Netzwerk um die Interaktionen zwischen den spät agierenden CIA-Proteinen

und den neu gefundenen Komplexbpartnern Yae1 und Lto1 erweitert. Diese wurden durch TAP-MS und Ko-Immunpräzipitationsversuche detektiert. Es wurde zusätzlich durch Ko-Immunpräzipitation gezeigt, dass die Interaktionen von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex durch Depletion des frühen CIA-Faktors Nbp35 stabilisiert werden (gelbe Linien).

2.2.3 Die Depletion von Yae1 und Lto1 beeinflusst die Reifung des Fe-S Proteins Rli1

Zur Aufklärung der Funktion der beiden Proteine Yae1 und Lto1 bei der Reifung ihres Komplexpartners Rli1 wurden zunächst regulierbare Mutanten generiert. Dabei wurden die endogenen Promotoren von *YAE1* sowie *LTO1* durch einen *GALL*-Promotor ersetzt und die Expression der jeweiligen Gene durch Zugabe von Glucose zum Wachstumsmedium reprimiert. Anschließend wurde der Einfluss der potenziellen CIA-Faktoren Yae1 und Lto1 auf die Reifung des Fe-S Proteins Rli1 durch die Markierung mit ^{55}Fe untersucht. Das Zielprotein Rli1 wurde in Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen überexprimiert und die Zellen gleichzeitig 40 h für Yae1 oder Lto1 depletiert. Nach der Markierung mit ^{55}Fe wurde die mit dem Fe-S Protein präzipitierte Radioaktivität in den Yae1- und Lto1-depletierten Zellen mit der assoziierten Radioaktivität in Wildtyp- und Nbp35-depletierten Zellen verglichen (**Abb. 2.13**). Die Depletion von Yae1 führte zu einem Fe-S Cluster-Synthesedefekt von Rli1, der vergleichbar mit dem Effekt nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35 war. Eine Western Blot-Analyse bestätigte dabei, dass lediglich die Fe-S Cluster-Synthese beeinträchtigt war und nicht die Stabilität bzw. Proteinmenge von Rli1 selbst. Im Gegensatz dazu führte die Depletion von Lto1 zu einem weniger ausgeprägten Phänotyp. Zwar war die Reifung von Rli1 auch in dieser Mutante beeinträchtigt, jedoch nicht in dem Maße, wie nach Depletion von Yae1 und Nbp35.

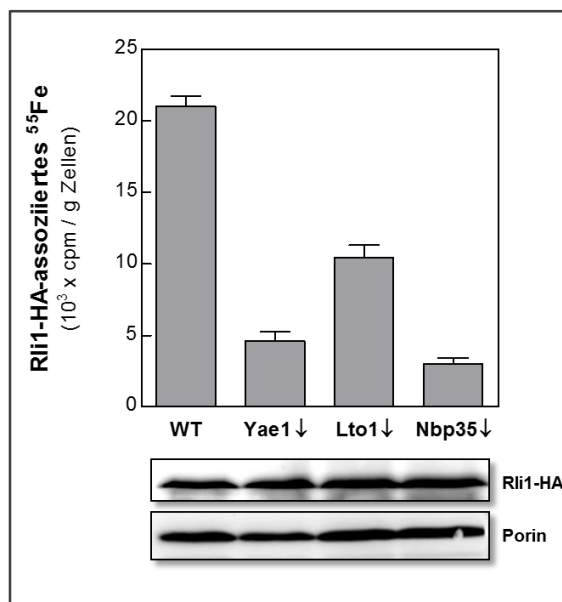


Abb. 2.13 Die Depletion von Yae1 hat den gleichen Effekt auf die Fe-S Cluster-Biogenese von Rli1, wie die Depletion des Reifungsfaktors Nbp35. WT (W303a)-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-NBP35-Zellen wurden mit einem Plasmid zur Überexpression von Rli1-HA transformiert. Die Zellen wurden für Yae1, Lto1 oder Nbp35 depletiert und 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend erfolgte die Markierung mit ^{55}Fe für 2 h. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation von Rli1-HA mit HA-Sepharose und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von mindestens vier unabhängigen Messungen an. Der Nachweis der Proteinmenge von Rli1-HA erfolgte durch Immundetektion mit einem αHA Antikörper (Porin = Ladekontrolle).

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex von physiologischer Relevanz ist und dass Yae1 und Lto1 für die Eisenbindung an das Fe-S Protein Rli1 benötigt werden. Dabei war nicht deutlich, ob es sich bei beiden Faktoren um neue Komponenten der CIA-Maschinerie handelt, oder ob sie Stabilisatoren für Rli1 sind. Aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften und der hohen Konservierung ihrer Glycin-reichen Domäne, hätte man erwartet, dass die Depletion beider essentieller Faktoren den gleichen Effekt auf die Reifung von Rli1 hervorruft. Allerdings konnte dies durch die Analyse der Maturierung von Rli1 nicht bestätigt werden. Ein Wachstumstest zeigte hingegen, dass die verwendeten *GALL*-Mutanten unter Depletionsbedingungen nicht denselben Phänotyp haben (**Abb. 2.14**). Während beide *GALL*-Mutanten auf Galactose-haltigen Platten Wildtyp-artiges Wachstum zeigten, war die Depletion von Yae1 für die Zelle letal. Im Gegensatz dazu zeigte die Lto1-Mutante nach Depletion des essentiellen Faktors keinen Wachstumsdefekt. Im folgenden Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Beobachtungen auf eine falsche Annotation des Startcodons von *LTO1* in der *Saccharomyces* Genomdatenbank (SGD) zurückzuführen waren. Das führte dazu, dass die *GALL*-Kassette nicht direkt vor dem Transkriptionsstart von *LTO1* integriert und damit die Expression dieses Gens nicht effizient reprimiert wurde.

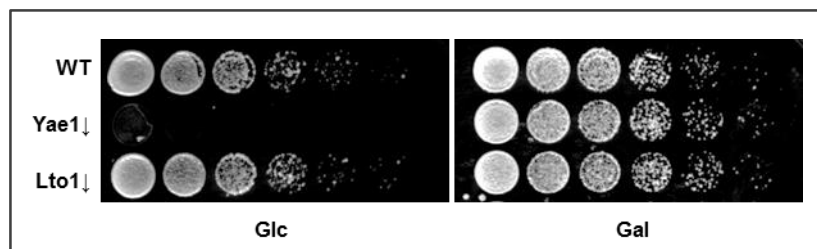


Abb. 2.14 Die Depletion des essentiellen Faktors Lto1 im *GALL*-Stamm erzeugt keinen Wachstumsdefekt. Zur Erzeugung regulierbarer Stämme wurden die endogenen Promotoren von *YAE1* und *LTO1* durch einen Galactose-regulierbaren Promotor ausgetauscht. Die *GALL*-Kassette wurde durch homologe Rekombination direkt vor das annotierte Startcodon beider Gene integriert. Wildtyp (W303a)-, Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen wurden 16 h depletiert (YP mit Glucose) und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert $OD_{600} = 0,5$) auf Vollmedium-Agarplatten mit Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) aufgebracht. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3 Identifizierung des physiologischen Transkriptionsstarts von *LTO1*

Für die Methode des Promotoraustauschs zur Erzeugung von regulierbaren Hefestämmen ist man üblicherweise auf die in der SGD (*Saccharomyces Genome Database*) annotierten Startcodons der jeweiligen Gene angewiesen. Diese Annotationen basieren auf bioinformatischen Analysen, die meist das erste ATG, das im Leseraster mit der kodierenden Sequenz liegt, als Startcodon festlegen und damit

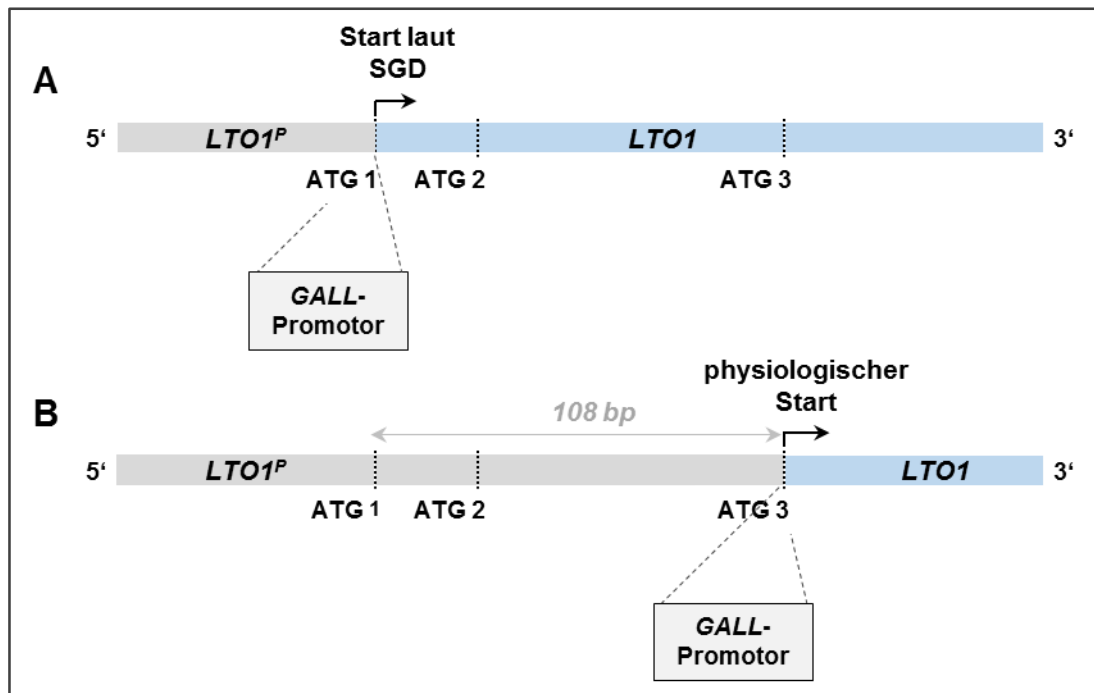


Abb. 2.16 Herstellung einer regulierbaren *LTO1*-Mutante durch Integration des *GALL*-Promotors an unterschiedlichen Stellen im Genom. Zur Herstellung einer Mutante, in der die Expression von *LTO1* durch Zugabe unterschiedlicher Kohlenstoffquellen zum Medium reguliert werden kann, wurde der *GALL*-Promotor an unterschiedlichen Stellen im Hefegenom integriert. **(A)** Integration des *GALL*-Promotors vor das von der SGD (*Saccharomyces Genome Database*) annotierte Startcodon von *LTO1* (ATG 1). **(B)** Integration des *GALL*-Promotors 108 bp stromabwärts des annotierten Startcodons (ATG 3). ATG 2 befindet sich 27 bp stromabwärts des annotierten Startcodons. *LTO1^P*: Promotorbereich des *LTO1* Gens.

Die Hypothese einer falschen Startcodon-Annotation von *LTO1* konnte mithilfe eines Wachstumstests unterstützt werden (**Abb. 2.17**). Wurde der *GALL*-Promotor vor das von der SGD annotierte Startcodon gesetzt, führte die Kultivierung auf Glucose-haltigen Platten nicht zu einer Beeinträchtigung des Wachstums (s.o.), obwohl damit ein essentieller Faktor depletiert wurde. Für die neu generierte Mutante, bei der die *GALL*-Kassette 108 bp stromabwärts integriert wurde, war die Depletion von Lto1 jedoch letal. Dieses Verhalten war sehr ähnlich zum Wachstumsphänotyp von *GALL*-YAE1 Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte die *GALL*-*LTO1* Mutante nach Kultivierung auf Galactose-haltigen Platten Wildtyp-artiges Wachstum, was bestätigt, dass die Depletion des N-Terminus um 36 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Damit wurde der physiologische Transkriptionsstart von *LTO1* neu definiert und auf einen Bereich festgesetzt, der sich 108 bp stromabwärts vom eigentlich annotierten Startcodon befindet. Durch folgende bioinformatische, zellbiologische und biochemische Analysen wurde dieses Ergebnis zusätzlich bestätigt.

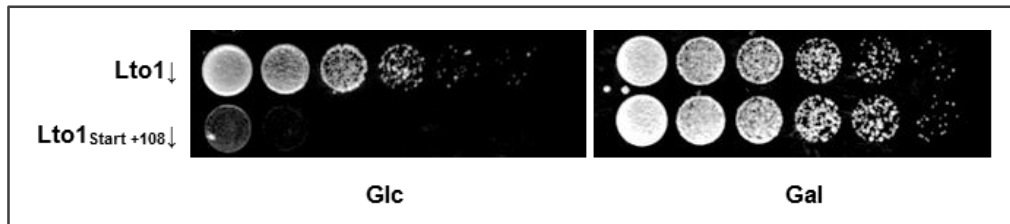


Abb. 2.17 Der physiologische Transkriptionsstart von *LTO1* entspricht nicht dem in der SGD annotierten Startcodon. Zur Regulation der *LTO1*-Expression wurden zwei Mutanten generiert. In der ersten Mutante wurde die *GALL*-Kassette vor das als Startcodon annotierte ATG integriert (*Lto1*), in der zweiten Mutante wurde die Kassette vor ein 108 bp weiter 3' liegendes ATG eingesetzt (*Lto1^{Start+108}*). *Gal-LTO1*- und *Gal-LTO1^{Start+108}*-Zellen wurden 16 h depletiert (YP mit Glucose) und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert $OD_{600} = 0,5$) auf Vollmedium-Agarplatten mit Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) aufgebracht. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.3.1 Bioinformatische Identifizierung des korrekten Transkriptionsstarts von *LTO1*

Zur Bestätigung des neuen Transkriptionsstarts von *LTO1* erfolgte zunächst eine bioinformatische Analyse des translatierten Bereiches via Ribosomen-*footprinting*. Die Methode des Ribosomen-*footprinting* wurde 2009 erstmals publiziert und dient dem systematischen Nachweis translatierter Fragmente in *S. cerevisiae* (Ingolia *et al.*, 2012; Ingolia *et al.*, 2009). Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Ribosomen während der Translation einen Bereich von ca. 30 Nukleotiden des mRNA Moleküls vor Verdau mit Nuklease schützen (*footprint*). Die Sequenzen der „geschützten“ mRNA können dann in DNA überschrieben werden und durch Sequenzierung erfolgt die Quantifizierung solcher *footprints*. Die Bestimmung der Proteinsynthese soll dabei sogar noch bessere Vorhersagen über die Häufigkeit eines Proteins erlauben, als die Bestimmung der mRNA Mengen. Als Maß für die Translationseffizienz wurden Ribosomen-*footprints* in Relation zu mRNA Fragmenten gesetzt. Die im Rahmen der oben genannten Studie generierte Datenmenge wurde verwendet, um den physiologischen Transkriptionsstart von *LTO1* auch durch bioinformatische Analysen zu bestätigen und den tatsächlich translatierten Bereich zu definieren. Für die *footprint*-Analyse wurden alle vier Datensätze von GEO (*Gene Expression Omnibus*, #GSE13750) heruntergeladen (GSM 346-111, -114, -115, -116). Mithilfe von *Microsoft Access* konnten die Daten gelesen und nach relevanten Bereichen, hier Chromosom XIV, sortiert werden. *Reads*, die zu Chromosom XIV und der *Lto1*-kodierenden Region gehörten, wurden in *Excel* weiter bearbeitet. Gleichmaßen wurden die mRNA-Daten behandelt. Die hierfür nötigen Datensätze waren GSM346-117 und -118. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in **Abb. 2.18** zusammengestellt. Ein Maximum repräsentiert dabei eine Stelle der mRNA, die durch ein Ribosom besetzt war, also tatsächlich translatiert wurde. Für *Lto1* konnte gezeigt werden, dass ein solches Signal nicht direkt in dem Bereich auftaucht, der laut SGD dem

Anfangsbereich des Proteins entsprechen sollte. Wie bereits unter 2.3 erläutert, ist davon auszugehen, dass diese Startcodon-Annotation unter physiologisch relevanten Bedingungen nicht dem meist frequenten Startcodon entspricht. Tatsächlich entspricht der Bereich, der vom Ribosom besetzt war, und somit wirklich translatiert wird, exakt dem 108 bp weiter abwärts liegenden Bereich. Diese Daten sind mit der in **Abb. 2.17** gemachten Beobachtung zum Wachstum der verschiedenen *GALL*-Mutanten vereinbar und unterstützen den Befund, dass das *LTO1*-Startcodon nicht an der bisher angenommenen Stelle liegt, sondern 108 bp weiter stromabwärts. Damit wurde der physiologische Transkriptionsstart für *LTO1* auch bioinformatisch festgelegt.

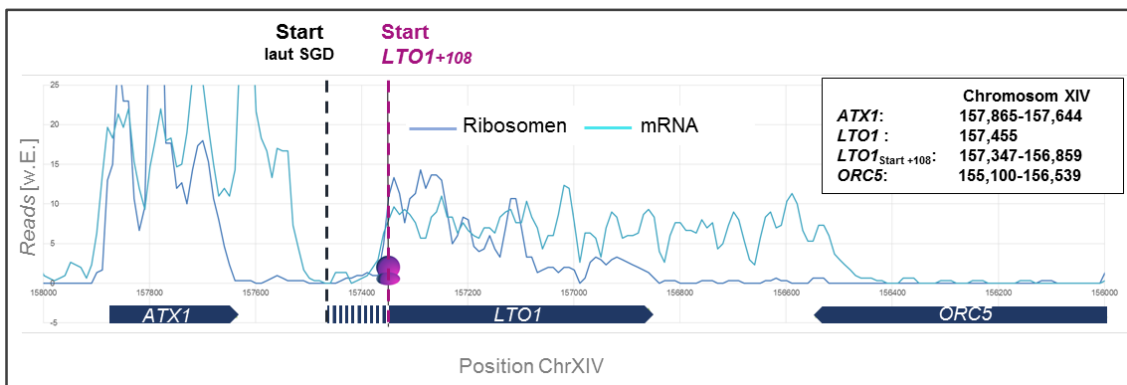


Abb. 2.18 Ribosomen-footprinting erlaubt den Nukleotid-genauen Nachweis des Translationsstarts von *Lto1*. Zum Nachweis translatierter Bereiche werden die Positionen von Ribosomen durch Nuklease-vermittelten Verdau der translatierten mRNA und anschließende Sequenzierung bestätigt. Ribosomen- und mRNA-Daten wurden von GEO (*Gene Expression Omnibus*, #GSE13750) bezogen und in *Microsoft Access* importiert (Ingolia *et al.*, 2009). Daten wurden auf den relevanten Bereich des Chromosoms XIV reduziert. Nach dem Import der Datenmenge in *Excel* erfolgte die Bestimmung der *Reads* pro 30 bp langer Fragmente des Chromosoms XIV. Die schwarze Linie repräsentiert den Translationsstart nach Angabe der SGD (*Saccharomyces Genome Database*). In pink ist die Stelle des 108 bp abwärts liegenden physiologischen Translationsstarts von *Lto1* markiert (Start *LTO1*+108). *ATX1* und *ORC5*: Referenzgene auf beiden Flanken des *LTO1* Gens.

2.3.2 Biochemische und zellbiologische Verifizierung des *LTO1* Startcodons

Neben der bioinformatischen Analyse des Transkriptionsstarts von *LTO1* sollte durch zellbiologische und biochemische Methoden gezeigt werden, dass das von der SGD annotierte Startcodon nicht dem physiologischen Start entspricht. Dazu wurde untersucht, ob das ATG 1 (Start laut SGD) und das weiter 3' liegende ATG 2 kodierend sind. Nach Mutation von ATG 1 und ATG 2 in ein Stopcodon konnte kein Wachstumsdefekt der Zelle beobachtet werden (**Abb. 2.19 A**). Damit ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen beiden ATGs um Teile des Promotorbereiches und nicht um kodierende Bereiche handelt. Dies wurde überdies durch Verwendung eines LUX-Reporterkonstruktes bestätigt. Die Expression des Reporters unterlag dabei der

Kontrolle verschiedener Fragmente des *LTO1*-Promotors (**Abb. 2.19 B**). Ein 567 bp langes Fragment direkt vor dem physiologischen Start wurde dabei als Promotorsequenz definiert und zeigte maximale Aktivität. Die Kürzung dieses Promotors vom 3' Ende her führte zur Verringerung der Aktivität. Dabei wurde die geringste Aktivität für ein Promotorkonstrukt verzeichnet, das weder ATG 1 noch ATG 2 enthielt.

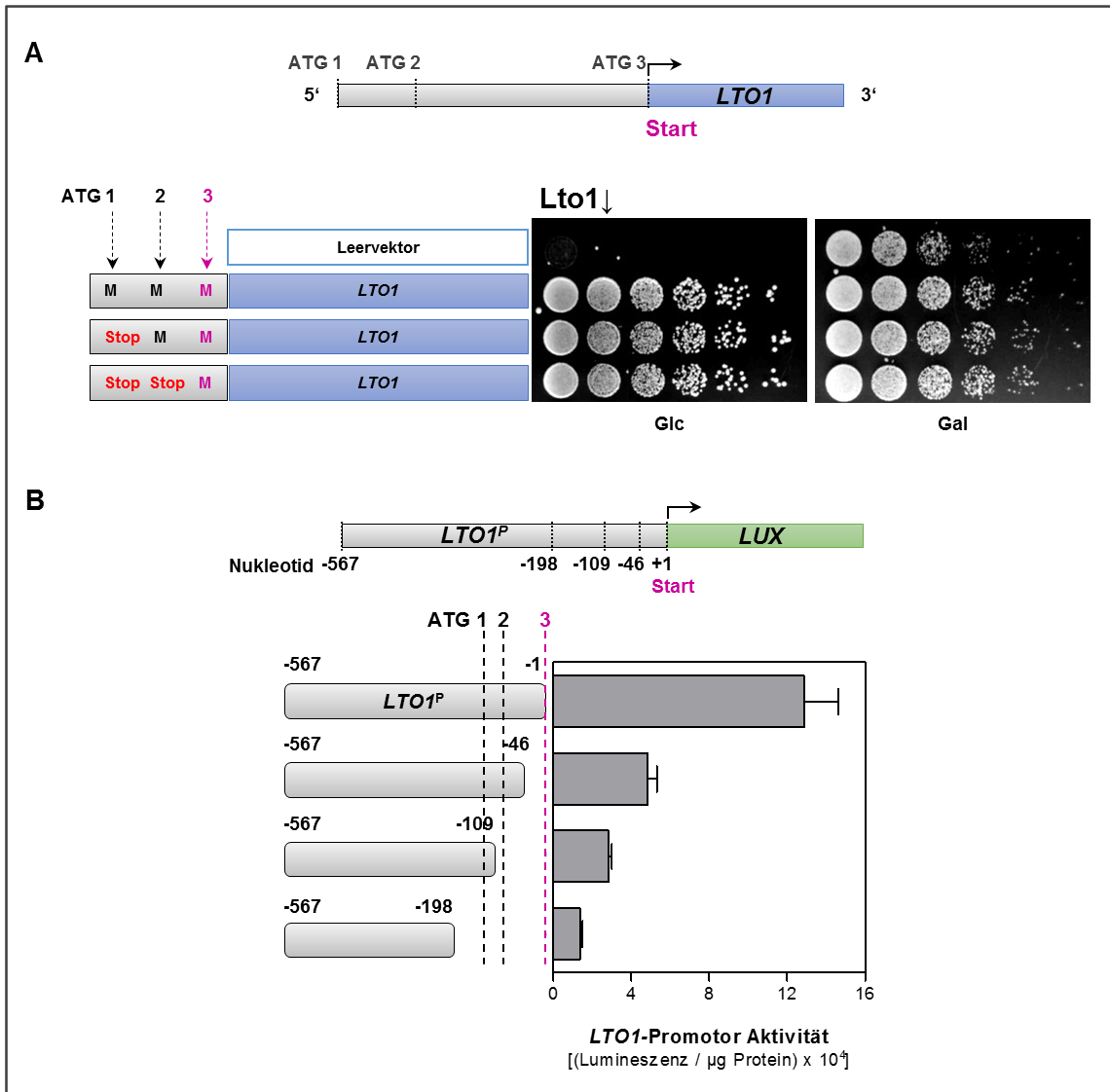


Abb. 2.19 Der Bereich unmittelbar vor dem physiologischen Transkriptionsstart von *LTO1* kann als Promotorregion definiert werden. (A) Gal-*LTO1*_{Start+108}-Zellen wurden mit einem Leervektor oder Vektoren zur Expression von *LTO1* unter Kontrolle des endogenen Promotors transformiert. Die ATGs an Position 1 und 2 wurden zu Stopcodons mutiert. Transformierte Zellen wurden 16 h in Minimalmedium mit Glucose kultiviert, um endogenes *Lto1* zu depletieren und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert OD₆₀₀ = 0,5) auf Selektiv-Agarplatten mit Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) aufgebracht. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert. **(B)** Unterschiedlich lange Fragmente des *LTO1*-Promotors (*LTO1*^P) wurden mit dem *LUX*-Reporter gen fusioniert. WT (W303a)-Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten transformiert und in Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Die Promotoraktivitäten exponentiell wachsender Zellen wurden durch Messung der Luciferase-spezifischen Lichtemission bestimmt und auf die Proteinmenge normalisiert. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von vier unabhängigen Messungen an.

Dieses Ergebnis war ein weiterer Hinweis, dass es sich bei den beiden Codons um Teile des Promotors handelt und nicht um eine kodierende Sequenz. Dieser Befund wurde zudem durch die Bestimmung des AT-Gehaltes belegt. Dabei wurden für die kodierenden Regionen des Referenzgens *ATX1* und *LTO1* ein AT-Gehalt von 65,8 respektive 65,0 % bestimmt. Der Bereich (108 bp) vor dem kodierenden Bereich von *LTO1* zeigte, vergleichbar mit der intergenen Region zwischen *ATX1* und *LTO1*, demgegenüber einen AT-Gehalt von 75 % auf.

In diesem Teil der Arbeit konnte der physiologische Transkriptionsstart von *LTO1* identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass ein 108 bp stromabwärts vom in der SGD annotierten Startcodon liegendes ATG den physiologischen Startpunkt der Transkription bildet. Die damit einhergehende Translation eines um 36 Aminosäuren kleineren Proteins wurde zudem durch Ribosomen-*footprinting* bioinformatisch bestätigt. Durch Ko-Immunpräzipitationsversuche und Wachstumstests wurde gezeigt, dass die Verlängerung des N-Terminus um 36 Aminosäuren die Funktion von Lto1 nicht beeinträchtigt. Unter Verwendung von Reporterkonstrukten konnte nachgewiesen werden, dass das in der SGD annotierte Startcodon einen Teil der Promotorsequenz darstellt, und damit nicht kodierend ist. Die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Lto1 auf die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine, wurden daher mit dem Stamm durchgeführt, in dem der *LTO1* Promotor vollständig gegen den *GALL*-Promotor ausgetauscht wurde.

2.4 Yae1 und Lto1 sind essentiell für die *de novo*

Fe-S Cluster-Biogenese von Rli1,

aber nicht für die Reifung anderer Fe-S Proteine

Im bisherigen Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Yae1 und Lto1 mit dem CIA-Targetingkomplex interagieren und einen Einfluss auf die Reifung ihres Komplexpartners Rli1 haben. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass es sich bei diesen beiden Faktoren um neue CIA-Proteine handelt. Für die Charakterisierung als CIA-Faktoren müssen jedoch weitere Kriterien erfüllt sein. So konnte für die anderen acht bisher in der Hefe beschriebenen Komponenten der CIA-Maschinerie gezeigt werden, dass sie gleichermaßen bei der Maturation aller [4Fe-4S]-Proteine benötigt werden. Beispiele solcher Fe-S Zielproteine, deren Reifung relativ einfach durch Markierung mit ⁵⁵Fe nachgewiesen werden kann, sind die im Zellkern lokalisierte Helikase Rad3, die DNA-Glykosylase Ntg2 und die DNA-Polymerase Pol3. Zur Detektion der Fe-S Cluster-Neusynthese von Pol3 ist die Ko-Expression ihrer akzessorischen Untereinheit Pol31 notwendig (Netz *et al.*, 2012b). Ein weiteres zytosolisches

Fe-S Protein, das als Reporter benutzt werden kann, ist Leu1 (Isopropylmalat Isomerase), ein Enzym der Leucinbiosynthese.

Im Folgenden sollte der Einfluss der potenziellen CIA-Faktoren Yae1 und Lto1 auf die Reifung einer Auswahl von Fe-S Zielproteinen untersucht werden. Dazu wurden die jeweiligen Fe-S Proteine in Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen überexprimiert und die Zellen gleichzeitig 40 h für Yae1 oder Lto1 depletiert. Nach der Markierung mit ⁵⁵Fe wurde die mit den Zielproteinen assoziierte Radioaktivität in den Yae1- und Lto1-depletierten Zellen mit der assoziierten Radioaktivität in Wildtyp- und Nbp35-depletierten Zellen verglichen (**Abb. 2.20**). Wie bereits oben gezeigt, führte die Depletion von Yae1 und wahrscheinlich auch Lto1 zu dem Fe-S Cluster-Synthesedefekt von Rli1, den man auch nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35 beobachtet (**Abb. 2.13**). Bei Verwendung der korrekten Gal-LTO1-Mutante zeigte sich nun, dass die Depletion von Lto1 den gleichen Reifungsdefekt von Rli1 hervorruft, wie die Depletion seines Komplexpartners Yae1 oder des CIA-Faktors Nbp35 (**Abb. 2.20 A**). Eine Western Blot-Analyse bestätigte, dass lediglich die Fe-S Cluster-Synthese beeinträchtigt war und nicht die Stabilität von Rli1 (**Abb. 2.20 F**). Dieser Befund verdeutlichte erneut die physiologische Relevanz der Interaktion von Yae1 und Lto1 sowohl mit dem CIA-Targetingkomplex als auch mit dem Fe-S Protein Rli1.

Wie bereits erwähnt, erwartete man nach der Depletion eines CIA-Faktors einen Reifungsdefekt aller zytosolischen und nukleären Fe-S Zielproteine. Dieser Phänotyp konnte überraschenderweise jedoch nicht für die beiden Faktoren Yae1 und Lto1 beobachtet werden. Es zeigte sich in folgenden Untersuchungen, dass die Depletion der beiden Proteine keinen Fe-S Cluster-Biogenesedefekt der nukleären Fe-S Proteine Rad3, Ntg2 und Pol3-CTD zur Folge hatte (**Abb. 2.20 C, D, E**). Auch die Reifung des zytosolischen Fe-S Proteins Leu1 war nach Depletion von Yae1 und Lto1 nicht so stark beeinträchtigt wie nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35 (**Abb. 2.20 B**). Allerdings konnte ein leichter Effekt auf die Reifung dieses Zielproteins in Abwesenheit von Yae1 und Lto1 beobachtet werden.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den zwei untersuchten Proteinen um CIA-Faktoren handelt, die allerdings keine generelle Funktion bei der Reifung aller zytosolischen und nukleären Fe-S Zielproteine übernehmen. Viel eher wurde mit dieser Analyse deutlich, dass Yae1 und Lto1 hoch spezifisch für die Maturierung nur eines Zielproteins (Rli1) verantwortlich sind.

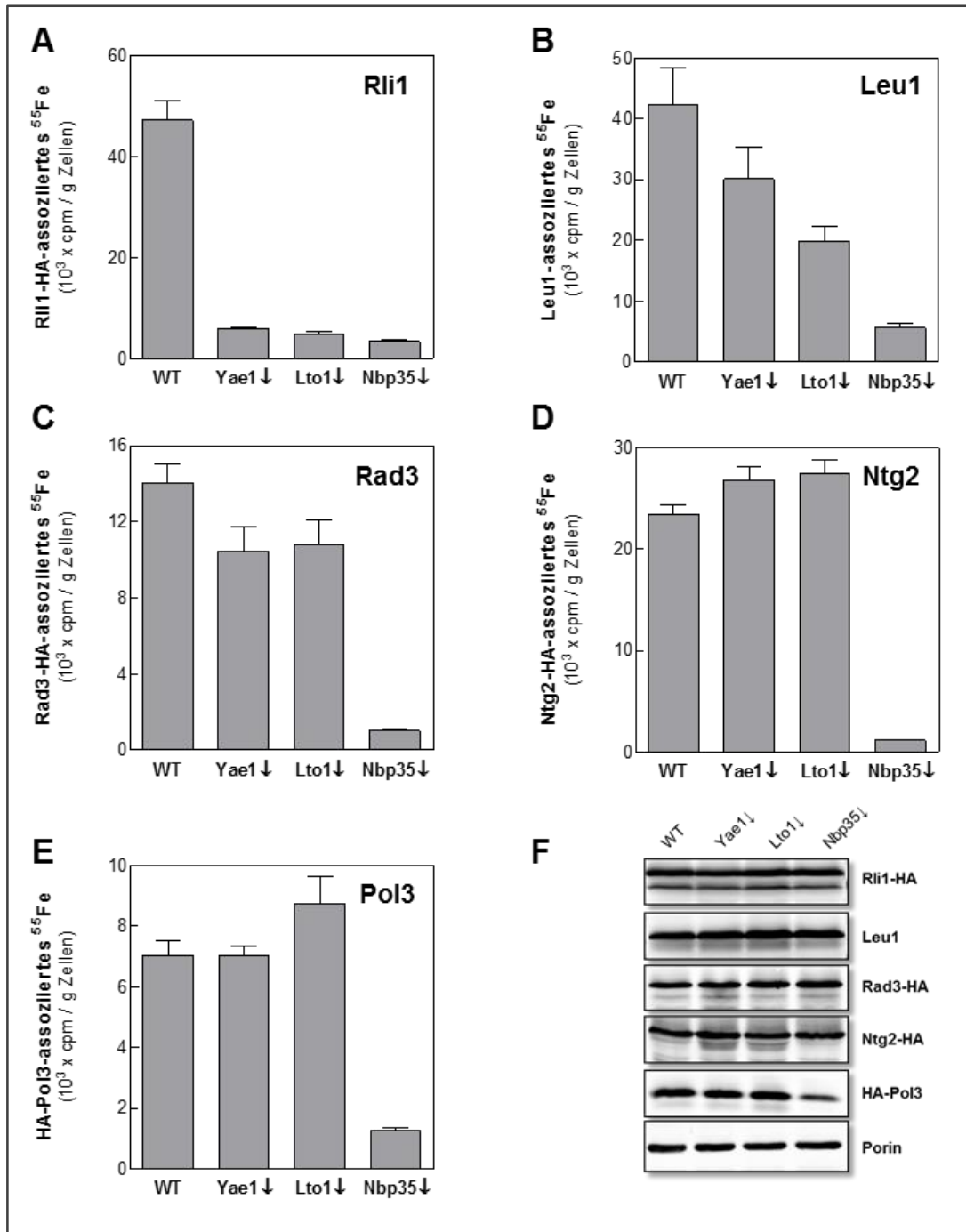


Abb. 2.20 Yae1 und Lto1 sind spezifisch an der Reifung des essentiellen ribosomalen Proteins Rli1 beteiligt. WT (W303a)-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-NBP35-Zellen wurden mit Plasmiden zur Überexpression der folgenden Fe-S Proteine transformiert: **(A)** RNase-L Inhibitor Rli1-HA, **(C)** Helikase Rad3-HA, **(D)** DNA-Glycosylase Ntg2-HA und **(E)** C-terminale Domäne (CTD) der DNA-Polymerase Pol3 mit HA-Tag und seiner akzessorischen Untereinheit Pol31. Die Zellen wurden für Yae1, Lto1 oder Nbp35 depletiert und 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend erfolgte die Markierung mit ^{55}Fe für 2 h. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation der Zielproteine mit HA-Sepharose oder in **(B)** mit an Protein A-Sepharose gekoppelten Leu1 Antikörpern (Leu1 = Isopropylmalat Isomerase) und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von mindestens vier unabhängigen Messungen an. **(F)** Der Nachweis der Menge der Fe-S Proteine erfolgte durch Immundetektion unter Verwendung des αHA Antikörpers oder eines spezifischen Antikörpers gegen Leu1. Porin diente als Ladekontrolle.

Da aus den bisherigen Analysen nicht klar ersichtlich war, ob die Depletion von Yae1 bzw. Lto1 einen spezifischen Reifungsdefekt des Fe-S Proteins Leu1 hervorruft, sollte dies mit einer weiteren Methode untersucht werden. Die Reifung zytosolischer Fe-S Proteine lässt sich neben der *de novo* Fe-S Cluster-Synthese auch indirekt durch Aktivitätsmessungen von Enzymen mit Fe-S Kofaktoren verfolgen. Die zytosolische Isopropylmalat Isomerase Leu1 z.B. koordiniert einen [4Fe-4S]-Cluster, der essentiell für die Enzymaktivität ist.

Wie in **Abb. 2.20 B** gezeigt, war unter den gegebenen Versuchsbedingungen Leu1 neben Rli1 das einzige Zielprotein, das einen Maturierungsdefekt nach Depletion von Yae1 und Lto1 aufwies. Da dieser Effekt auf Leu1 nicht so stark ausgeprägt war, wie nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35, könnte der Reifungsdefekt auch durch indirekte Störung der Fe-S Cluster-Bindung an Leu1 zu erklären sein, da Leu1 einen besonders empfindlichen Fe-S Cluster bindet. Somit sollte die Aktivitätsbestimmung von Leu1 einen weiteren Hinweis auf die Spezifität dieses Effektes geben. Zusätzlich wurde die Aktivität der assimilatorischen Sulfid Reduktase verfolgt, deren β -Untereinheit (Met5 / Ecm17) ebenfalls einen [4Fe-4S]-Cluster koordiniert.

Die Aktivität von Leu1 wurde im Gesamtzellextrakt von WT-Zellen und Zellen, die 40 h für Yae1, Lto1 und Nbp35 depletiert wurden, bestimmt (**Abb. 2.21 A**). Sie unterschied sich in Yae1- oder Lto1-depletierten Zellen nicht wesentlich von der Aktivität im Wildtyp. Damit wurde ausgeschlossen, dass die beiden Faktoren für die Maturierung dieses Enzyms von Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu führte die Depletion des CIA-Proteins Nbp35 zu einem deutlichen Verlust der Leu1 Aktivität im Vergleich mit der Wildtyp-Zelle. Die Aktivität der assimilatorischen Sulfid Reduktase wurde *in vivo* unter Verwendung von Agarplatten mit Natriumsulfid und Ammoniumbismutcitrat bestimmt (**Abb. 2.21 B**). Das von der aktiven Sulfid Reduktase gebildete Sulfid kann protoniert werden, aus der Zelle diffundieren und dabei mit dem Bismutsalz zu einem braunen Präzipitat reagieren. Die Kultivierung auf Galactose-haltigen Platten bestätigte die Aktivität des Enzyms im Wildtyp und den verwendeten Gal-Mutanten (Gal-YAE1, Gal-LTO1, Gal-NBP35). Demgegenüber führte die Depletion von Nbp35 zum erwarteten Fe-S Cluster-Synthesedefekt und die Aktivität des Enzyms wurde stark beeinträchtigt (weiße Kolonien). Dieser Effekt wurde nicht nach Depletion von Yae1 und Lto1 beobachtet, was zeigt, dass diese beiden Proteine nicht an der Reifung der β -Untereinheit der Sulfid Reduktase beteiligt sind.

Eine Aktivitätsbestimmung der zytosolischen Alkohol Dehydrogenase diente als Referenz für diese Messungen. Dieses Enzym koordiniert keinen Fe-S Cluster und zeigte lediglich, dass die Depletion von Yae1 und Lto1 keinen generellen Effekt auf den Stoffwechsel der Zelle hatte (**Abb. 2.21 C**).

Um einen Einfluss der beiden Faktoren auf die Reifung mitochondrialer Fe-S Proteine auszuschließen, wurde die Aktivität der Aconitase in Yae1- und Lto1-depletierten Zellen bestimmt (**Abb. 2.21 D**). Im Vergleich zum Wildtyp konnte weder nach Depletion von Nbp35 noch nach Depletion von Yae1 und Lto1 ein Einfluss auf die Aktivität der Aconitase nachgewiesen werden. Es wurde damit bestätigt, dass Yae1 und Lto1 keine Rolle bei der Reifung dieses mitochondrialen Fe-S Proteins spielen.

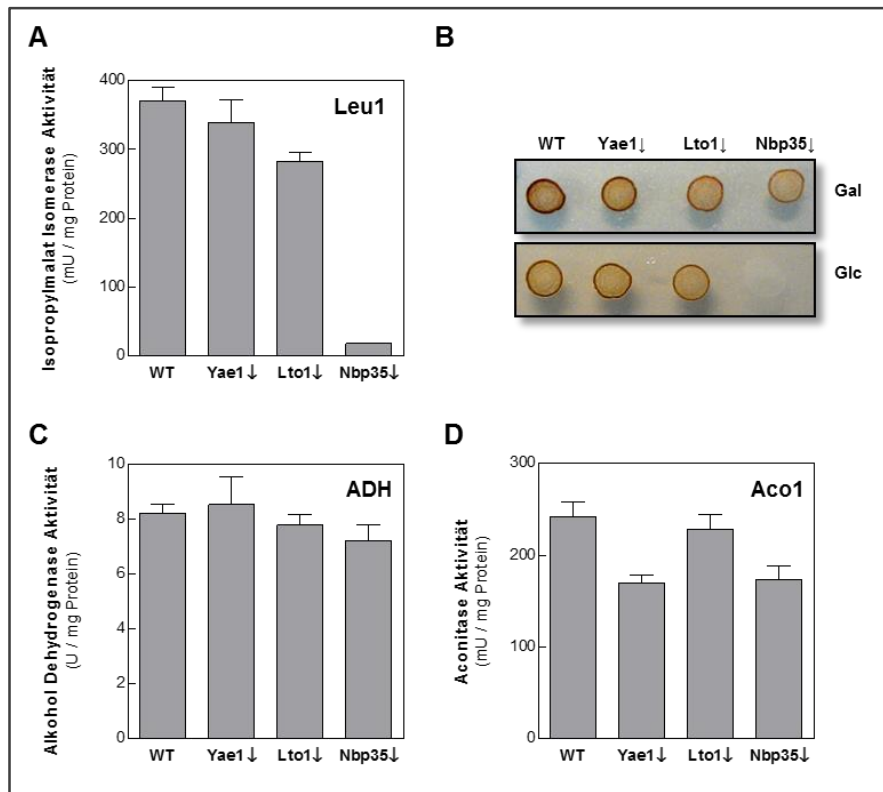


Abb. 2.21 Yae1 und Lto1 werden nicht für die Reifung der zytosolischen Fe-S Proteine Isopropylmalat Isomerase und Sulfid Reduktase benötigt. (A, C, D) WT (W303a)-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-NBP35-Zellen wurden 40 h auf Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Die Aktivitäten der zytosolischen Enzyme Isopropylmalat Isomerase (Leu1) und Alkohol Dehydrogenase (ADH), sowie der mitochondrialen Aconitase (Aco1) wurden im Gesamtzellextrakt bestimmt und auf die Proteinmenge normalisiert. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von vier unabhängigen Messungen an. **(B)** Aktivitätsbestimmung der assimilatorischen Sulfid Reduktase *in vivo*. WT (W303a)-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-NBP35-Zellen wurden auf Galactose-haltigen YP-Agarplatten kultiviert und auf Selektivplatten mit 1 % (w/v) β -Alanin, 0,1 % (w/v) Ammoniumbismutcitrat, 0,3 % (w/v) Natriumsulfit und Galactose (Gal) oder Glucose (Glc) überführt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 4 Tage bei 30 °C.

Die Rolle der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 als spät agierende und hoch spezifische CIA-Komponenten für das Zielprotein Rli1 wurde durch weitere Experimente belegt. Dazu wurde deren Einfluss auf die Reifung der Fe-S Cluster-kordinierenden CIA-Proteine Nbp35 und Nar1 untersucht (**Abb. 2.22 A, B**). Unter der Annahme, dass Yae1 und Lto1 sehr spät im Prozess der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese fungieren, war kein Effekt auf die Reifung dieser beiden CIA-Faktoren zu erwarten. Die jeweiligen

Zielproteine Nbp35 und Nar1 wurden in Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen überexprimiert und Yae1 oder Lto1 gleichzeitig für 40 h depletiert. Nach der Markierung mit ^{55}Fe wurde die mit den Zielproteinen assoziierte Radioaktivität in den Yae1- und Lto1-depletierten Zellen mit der assoziierten Radioaktivität in Wildtyp- und Yah1-depletierten Zellen verglichen. Die mit Nbp35 und Nar1 assoziierte Radioaktivität in Yae1- und Lto1-depletierten Zellen unterschied sich dabei nicht wesentlich von der im Wildtyp präzipitierten Radioaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich die Depletion von Yah1 zu einem Reifungsdefekt von Nbp35 und Nar1 führte. Die Depletion dieser mitochondrialen ISC-Komponente diente als Kontrolle und demonstrierte die Abhängigkeit der CIA-Maschinerie von den Mitochondrien. Diese Abhängigkeit wurde zudem durch eine Western Blot-Analyse bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Yah1 nicht nur einen Reifungsdefekt von Nar1 verursachte, sondern auch in einer verminderten Proteinstabilität resultierte (**Abb. 2.22 C**). Mit diesem Versuch wurde bestätigt, dass die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese und damit die Maturierung von Nbp35 und Nar1 nicht von der Expression der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 abhängig sind.

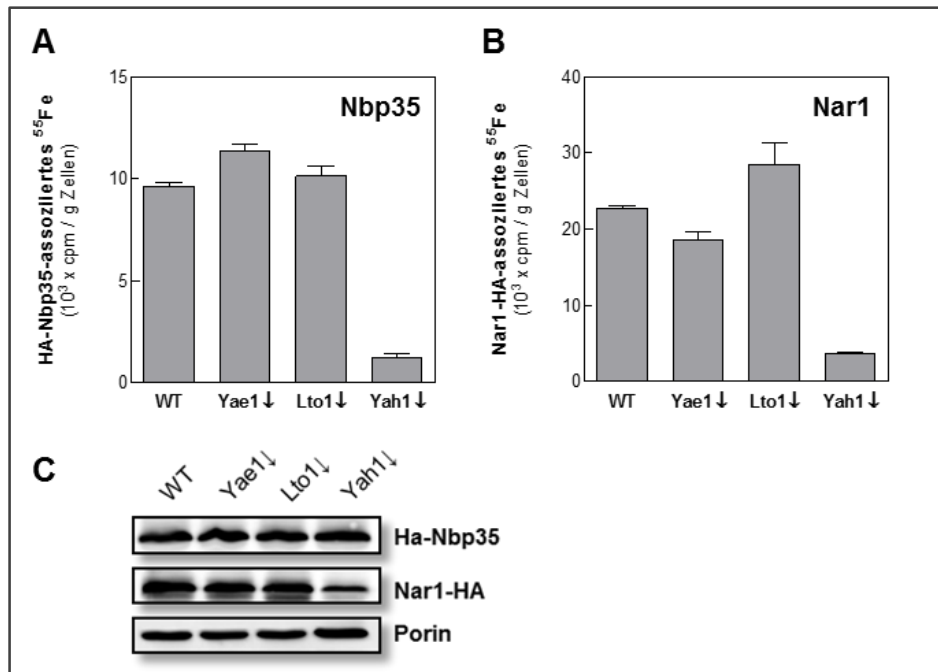


Abb. 2.22 Yae1 und Lto1 sind nicht an der Reifung der CIA-Proteine Nbp35 und Nar1 beteiligt. WT-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-YAH1-Zellen wurden mit Plasmiden zur Überexpression der Fe-S Cluster-koordinierenden CIA-Faktoren HA-Nbp35 (**A**) und Nar1-HA (**B**) transformiert. Die Zellen wurden für Yae1, Lto1 und Yah1 depletiert und 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Es folgte die Markierung mit ^{55}Fe für 2 h. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation der Zielproteine Nbp35 und Nar1 mit HA-Sepharose und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von mindestens vier unabhängigen Messungen an. (**C**) Der Nachweis der Menge der Fe-S Proteine erfolgte durch Immundetektion mit αHA Antikörpern oder einem spezifischen Antikörper gegen Porin (Ladekontrolle).

Zusammengefasst wurden in diesem Teil der Arbeit die beiden Proteine Yae1 und Lto1 als spezifische Interaktionspartner des CIA-Targetingkomplexes näher charakterisiert. Eine Funktion beider Komponenten bei der Maturierung des essentiellen ribosomalen Fe-S Proteins Rli1 konnte nachgewiesen werden. Für die Reifung aller anderen hier getesteten zytosolischen und nukleären Zielproteine (Leu1, Rad3, Ntg2, Pol3, Ecm17) konnte die Notwendigkeit von Yae1 und Lto1 jedoch ausgeschlossen werden. Auch die Reifung der beiden CIA-Faktoren Nbp35 und Nar1 erfolgt unabhängig von diesen beiden Proteinen. Aufgrund dieser Substratspezifität unterscheiden sich Yae1 und Lto1 grundlegend von anderen CIA-Faktoren, die eine Rolle bei der Biogenese aller zytosolischen und nukleären Fe-S Zielproteine spielen.

2.5 Sind Yae1 und Lto1 an der Reifung des Fe-S Proteins Rli1 oder an der Stabilisierung seiner Fe-S Cluster beteiligt?

Aus den bisher geschilderten Ergebnissen dieser Arbeit geht eine spezifische Funktion der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 bei der Fe-S Cluster-Bindung des ribosomalen Proteins Rli1 hervor. Die genaue Funktion dieser beiden Proteine ist jedoch unklar. Während dieser Untersuchungen wurde eine Arbeit veröffentlicht, die eine mögliche Erklärung für die spezifische Rolle dieser beiden Faktoren bei der Rli1 Reifung bereithält (Alhebshi *et al.*, 2012). Rli1 wurde als Achilles' Verse aerober Organismen charakterisiert, da dessen Fe-S Kofaktoren besonders empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind. Es wurde gezeigt, dass die Fe-S Cluster des Rli1 das primäre Ziel einer H₂O₂- oder Paraquat-vermittelten Schädigung von Rli1 sind. Es stellte sich daher die Frage, ob Yae1 und Lto1 tatsächlich die Fe-S Cluster nach deren Einbau in Rli1 stabilisieren und damit vor oxidativem Stress schützen oder ob sie für den Einbau der Cluster in die Polypeptidkette verantwortlich sind. Die erste Hypothese würde sich mit der Beobachtung vereinbaren lassen, dass beide Faktoren unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell sind (Snoek & Steensma, 2006). Im folgenden Teil der Arbeit sollte nun unterschieden werden, ob Yae1 und Lto1 eine Funktion bei der Stabilisierung der Fe-S Cluster von Rli1 haben oder ob sie spezifische Reifungsfaktoren für Rli1 sind. Die Untersuchung der Stabilität der Fe-S Cluster auf Rli1 erforderte zwei technische Voraussetzungen. Zum einen musste man ⁵⁵Fe radioaktiv markiertes Holo-Rli1 generieren, um dann die Stabilität der Fe-S Cluster über die Zeit verfolgen zu können. Zusätzlich musste man ein experimentelles System etablieren, das den schnellen und gezielten Abbau der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 erlaubt, um den Einfluss beider Proteine auf die Stabilität der Fe-S Cluster des Rli1 zu untersuchen (Abb. 2.23).

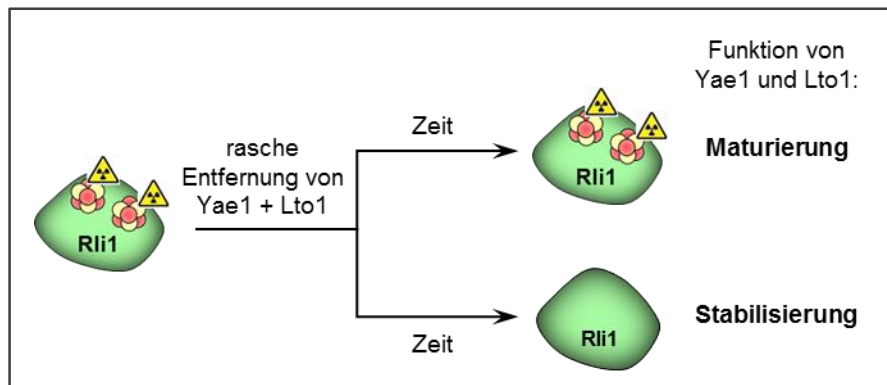


Abb. 2.23 Die Identifizierung der spezifischen Funktion von Yae1 und Lto1 in Bezug auf die Fe-S Cluster von Rli1 erfordert ein System, das den gezielten Abbau der Proteine erlaubt. Durch radioaktive Markierung mit ^{55}Fe wird Holo-Rli1 generiert. Nach funktioneller Depletion von Yae1 und Lto1 kann das Schicksal der Fe-S Cluster von Rli1 analysiert werden. Bleiben die Cluster stabil mit dem Zielprotein assoziiert, kann man davon ausgehen, dass Yae1 und Lto1 eine Funktion bei der Reifung des Rli1 haben. Wird durch den Abbau beider Faktoren auch eine Zerstörung der Fe-S Cluster bewirkt, kann man eine Funktion als Stabilisatoren annehmen.

Die bisher in dieser Arbeit verwendeten Gal-Mutanten konnten an dieser Stelle nicht verwendet werden, da die Depletion von Yae1 und Lto1 über 40 h erfolgte. Dieser Zeitraum ist für den natürlichen *Turn-over* der Rli1-Cluster in der Zelle sicherlich zu lange. Daher sollte dieses Problem durch die Fusion der Proteine Yae1 und Lto1 mit einem sog. Degron gelöst werden. Ein Degron ist eine spezifische Abfolge von Aminosäuren, die abhängig von einem bestimmten Signal den Startpunkt des proteasomalen Abbaus des Degron-haltigen Proteins bilden kann (Schrader *et al.*, 2009). Yae1 und Lto1 wurden für nachfolgende Untersuchungen C-terminal mit einem photosensitiven Degron (psd) fusioniert. Das Signal für den gezielten Abbau stellt hierbei die Bestrahlung mit Blaulicht dar. Dieses Degron setzt sich aus der LOV2 (*light oxygen voltage*)-Domäne des Phototropins von *A. thaliana* und dem Degron der Ornithin Decarboxylase (ODC) zusammen (Renicke *et al.*, 2013). Die Bestrahlung der Mutanten mit Blaulicht führt dabei zu einer Umstrukturierung der LOV2-Domäne bei gleichzeitiger Aktivierung des Degrons, gefolgt vom Proteasom-vermittelten Abbau des gesamten Fusionsproteins (**Abb. 2.24 A**). Es wurde gezeigt, dass der lichtinduzierte Abbau der beiden Proteine bereits nach 2 h maximal erfolgt war (**Abb. 2.24 B**). Besonders für das Yae1-Fusionsprotein konnte der gezielte Abbau beobachtet werden. Aufgrund der Protein-Neusynthese, die in diesem Experiment nicht unterbunden wurde, stellte sich jedoch eine *steady-state* Situation ein, in der sich induzierter Abbau und Neusynthese die Waage hielten. Wie ein Wachstumstest der Mutanten unter Bestrahlung mit Blaulicht zeigte, konnten so die Proteinmengen der essentiellen Faktoren Yae1 und Lto1 nicht auf ein kritisches Maß reduziert werden (**Abb. 2.24 C**). Da aber die Fe-S Cluster-Stabilität von Rli1 in vollkommener Abwesenheit von Yae1 und Lto1 untersucht werden sollte,

wurde in den folgenden Experimenten der Translationshemmer Cycloheximid verwendet.

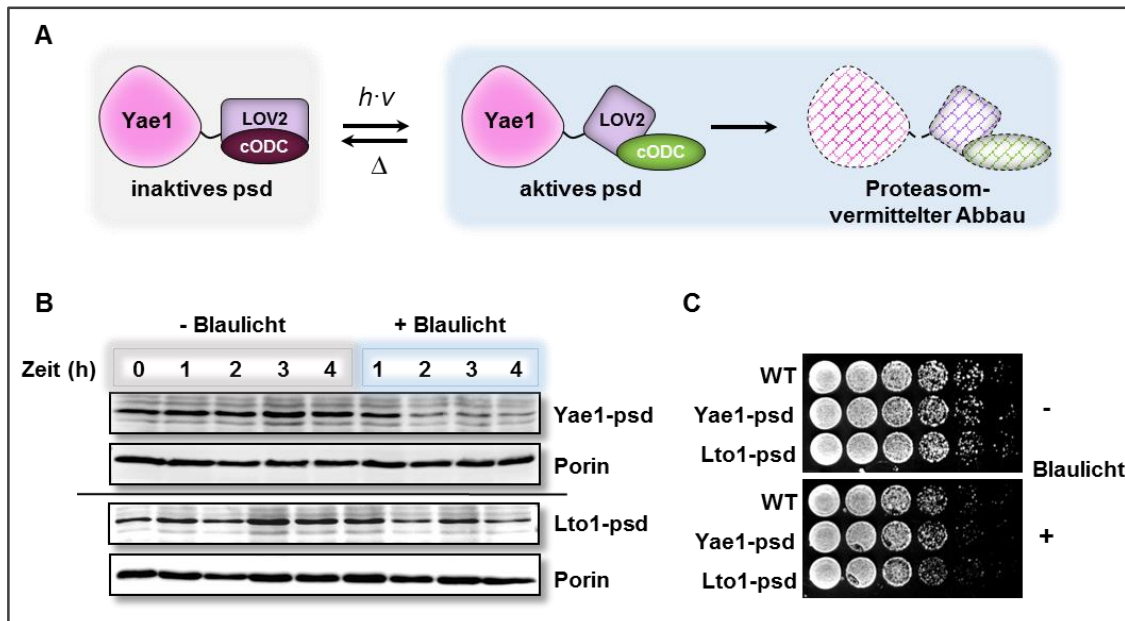


Abb. 2.24 Durch die Fusion mit einem photosensitiven Degron können Yae1 und Lto1 gezielt abgebaut werden. **(A)** Schematische Darstellung des Fusionsproteins aus Yae1-3Myc-AtLOV2-cODC1 und dessen Abbau nach Aktivierung des photosensitiven Degrons (psd) durch Bestrahlung mit Blaulicht (Renicke *et al.*, 2013). **(B)** Yae1-psd- und Lto1-psd-Mutanten wurden in LF (*low fluorescence*)-Medium mit Glucose im Dunkeln kultiviert. Nach Entnahme der ersten Probe (0 h), wurden die Zellen in Dunkelheit (grauer Rahmen) oder in Anwesenheit von Blaulicht (LED-Lampe 465 nm, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubiert (blauer Rahmen) und der Proteinabbau über die Zeit verfolgt. Der alkalischen Lyse und TCA-Fällung folgte die Trennung der Proteine mittels 12,5 % SDS-PAGE. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Immundetektion unter Verwendung von αMyc oder αPorin Antikörpern (Porin = Ladekontrolle). **(C)** Wildtyp (W303a)-, Yae1-psd- und Lto1-psd-Zellen wurden 16 h in LF-Medium mit Glucose im Dunkeln kultiviert und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert $\text{OD}_{600} = 0,5$) auf Vollmedium-Agarplatten mit Glucose aufgebracht. Die Platten wurden einen Tag in der Dunkelheit oder unter Bestrahlung mit Blaulicht (LED-Lampe 465 nm, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bei 30 °C inkubiert.

Um die möglichen Funktionen von Yae1 und Lto1 als Reifungsfaktoren für das Fe-S Protein Rli1 oder als Stabilisatoren der Fe-S Cluster des Rli1 zu unterscheiden, wurden die Methoden des ^{55}Fe Einbaus und des lichtinduzierten Abbaus von Proteinen vereint. Hierfür wurden die Proteine Yae1 und Lto1 durch die Fusion mit der photosensitiven Domäne gezielt abgebaut und das Schicksal der Rli1-assoziierten Fe-S Cluster durch Markierung mit ^{55}Fe verfolgt. Zunächst wurde untersucht, ob mit diesem Ansatz eine genügend starke Depletion von Yae1 und Lto1 erzielt werden kann, um einen Defekt in der Fe-S Cluster-Assoziation des Rli1 wie unter Verwendung der Gal-Mutanten zu beobachten (**Abb. 2.25**). Die photosensitive Variante von Lto1 konnte zur Untersuchung des Einflusses auf die Reifung von Rli1 nicht verwendet werden. So führte die Fusion des C-Terminus von Lto1 mit dem Degron zu einer Beeinträchtigung

des ^{55}Fe Einbaus in Rli1, auch wenn sich dies nicht im Wachstum der Zellen widerspiegelte (**Abb. 2.24 C**).

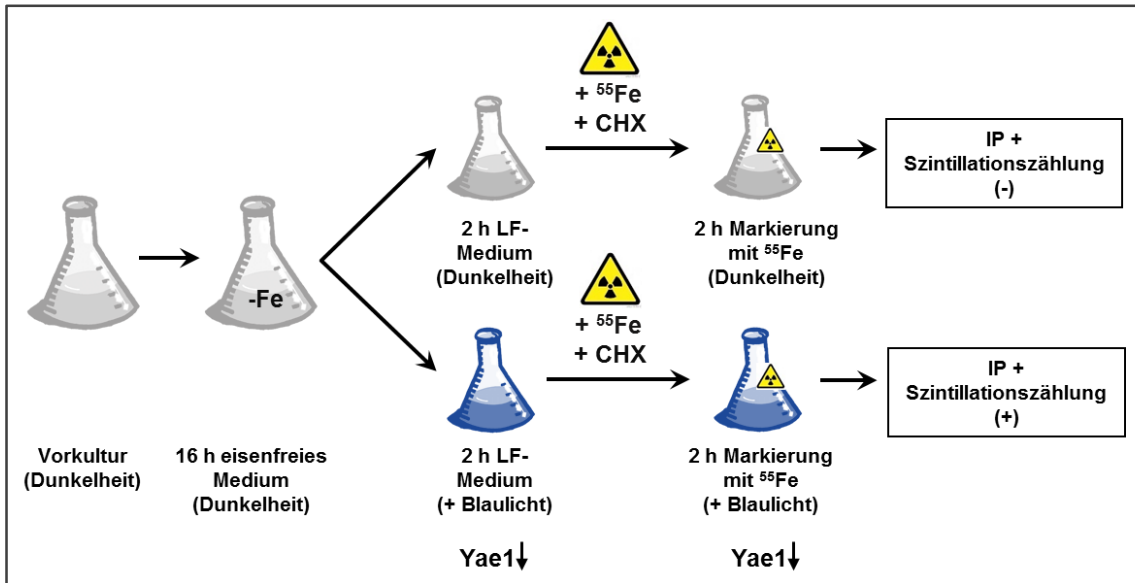


Abb. 2.25 Der lichtinduzierte Abbau von Zielproteinen und die Markierung von Fe-S Proteinen mit ^{55}Fe können kombiniert werden, um ein Protein als Reifungsfaktor zu charakterisieren. Yae1-psd-Zellen wurden unter Eisenmangel-Bedingungen (SC-Medium) in der Dunkelheit kultiviert. Nach der Überführung der Zellen in LFM (*low fluorescence medium*) wurde die Hälfte der Zellen weiter in Dunkelheit inkubiert und anschließend mit ^{55}Fe markiert, während für die andere Hälfte der lichtinduzierte Abbau von Yae1 durch 2 h Inkubation in Blaulicht erfolgte. Die Markierung mit ^{55}Fe erfolgte ebenfalls unter Blaulicht, um die Depletion von Yae1 während des Einbaus von ^{55}Fe in Zielproteine aufrecht zu erhalten. Die Zugabe von Cycloheximid (CHX) garantierte dabei, dass Yae1 nicht neu synthetisiert wurde. Für den Nachweis einer Funktion des Yae1 als Reifungsfaktor wurde der Einbau von ^{55}Fe in unterschiedliche Fe-S Proteine in An- und Abwesenheit von Yae1 untersucht (IP = Immunpräzipitation).

Hierzu wurden Wildtyp-Zellen und die Yae1-psd-Mutante mit einem Vektor zur Überexpression von Rli1 transformiert und unter Eisenmangel-Bedingungen kultiviert. Daran schloss sich eine zweistündige Inkubation in An- und Abwesenheit von Blaulicht an. Anschließend erfolgte die Markierung mit ^{55}Fe für 2 h unter Bestrahlung mit Blaulicht oder in der Dunkelheit, wobei die Zugabe von Cycloheximid die Protein-Neusynthese unterband und zur effizienten Depletion von Yae1 unter Bestrahlung mit Blaulicht führte. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese der beiden Proteine Rli1 und Leu1 als Kontrolle wurde in An- und Abwesenheit von Yae1 bestimmt (**Abb. 2.26 A, B**). Es konnte gezeigt werden, dass der Abbau von Yae1 den erwarteten Reifungsdefekt von Rli1 hervorrief. Im Vergleich zur Depletion des Yae1 unter Verwendung des Gal-Stammes ist der Reifungsdefekt jedoch weniger ausgeprägt (vgl. **Abb. 2.20 A**). Der vollständige Abbau des Yae1-Fusionsproteins in der Mutante wurde zudem über eine Western Blot-Analyse bestätigt (**Abb. 2.26 C**). Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte über einen Myc-Tag innerhalb der photosensitiven Domäne und nicht über einen Antikörper, der gegen endogenes Yae1 gerichtet ist. Dies erklärt die Abwesenheit des Signals im Wildtyp.

Gleichzeitig konnte per Western Blot gezeigt werden, dass unter den verschiedenen Bedingungen die Proteinmengen der Fe-S Proteine Rli1 und Leu1 unverändert waren. Die lichtinduzierte Depletion von Yae1 verursachte keinen Reifungsdefekt beim Referenzprotein Leu1 (**Abb. 2.26 B**). Dies unterstützt erneut die für Yae1 beschriebene hohe Substratspezifität für Rli1 und zeigt, dass die Yae1-psd Zellen für eine funktionelle Depletion des Yae1 nutzbar sind.

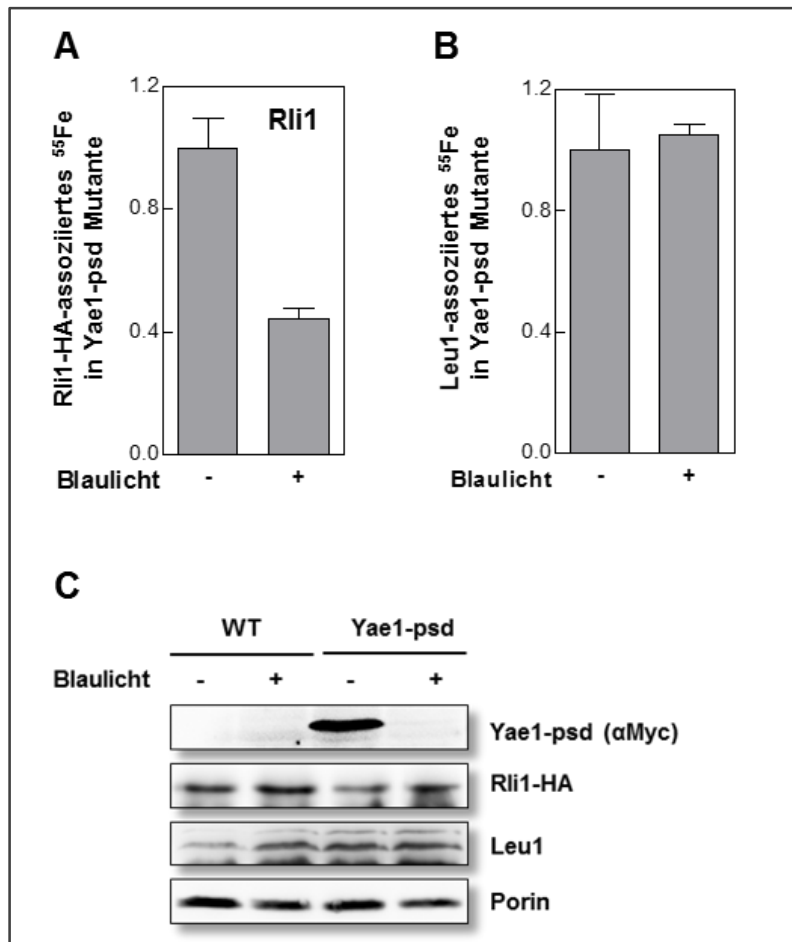


Abb. 2.26 Der lichtinduzierte Abbau von Yae1 beeinträchtigt die Reifung von Rli1. (A,B) WT (W303a)- und Yae1-psd-Zellen (psd = photosensitive Domäne) wurden mit einem Plasmid zur Überexpression von Rli1-HA transformiert. Die Zellen wurden in der Dunkelheit unter Eisenmangel (SC-Medium) kultiviert. 0,5 g Zellen wurden in 100 ml eisenarmen LF (*low fluorescence*)-Medium mit Glucose resuspendiert und anschließend für 2 h unter Bestrahlung mit Blaulicht (LED-Lampe 465 nm, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) oder in Dunkelheit bei 30 °C inkubiert. Die Markierung mit 10 μCi $^{55}\text{FeCl}_3$ erfolgte für 2 h in An- und Abwesenheit von Blaulicht (+/-). Cycloheximid wurde mit einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ zum Medium gegeben. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation der Zielproteine Rli1-HA und Leu1 mit HA-Sepharose oder an Protein A-Sepharose gekoppelten Leu1 Antikörpern und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität innerhalb der psd-Mutante wurde in Relation zur Radioaktivität im Wildtyp gesetzt. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Messungen an. (C) Der Nachweis der Menge der Fe-S Proteine erfolgte durch Immundetektion mit αHA und αLeu1 Antikörpern. Das Yae1-psd-Fusionsprotein wurde mittels αMyc Antikörper nachgewiesen (Porin = Ladekontrolle).

2.5.1 Yae1 hat keine Funktion bei der Stabilisierung der beiden Fe-S Cluster von Rli1

Unter Verwendung der photosensitiven Mutante von Yae1 sollte nun untersucht werden, ob dieses Protein einen stabilisierenden Effekt auf die Fe-S Cluster von Rli1 hat. Die Markierung der Fe-S Proteine mit ^{55}Fe und der sich daran anschließende lichtinduzierte Abbau von Yae1 sollten erlauben, das Schicksal der Fe-S Cluster über die Zeit in Abwesenheit von Yae1 zu verfolgen. Damit unterschied sich dieser Versuchsaufbau dahingehend von dem in **Abb. 2.25** gezeigten, dass die ^{55}Fe -Markierung des Rli1 dem Abbau von Yae1 vorausging (**Abb. 2.27**). WT- und Yae1-psd-Zellen wurden mit einem Vektor zur Überexpression von Rli1 transformiert und je drei Kulturen unter Eisenmangel in der Dunkelheit inkubiert. Nach der Markierung mit ^{55}Fe unter Ausschluss von Licht wurde die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese der ersten Kultur bestimmt. Dieser Wert sollte Aufschluss über die maximal mögliche Markierung der Fe-S Proteine geben. Ausgehend davon wurde die Fe-S Cluster-Stabilität nach Abbau von Yae1 nach 4 h untersucht. Dazu wurden die beiden übrigen Kulturen in LF-Medium überführt und in An- oder Abwesenheit von Blaulicht unter Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid für 4 h kultiviert. Daran schloss sich die Detektion der Fe-S Cluster-Menge durch Immunpräzipitation von Rli1 und Leu1 an.

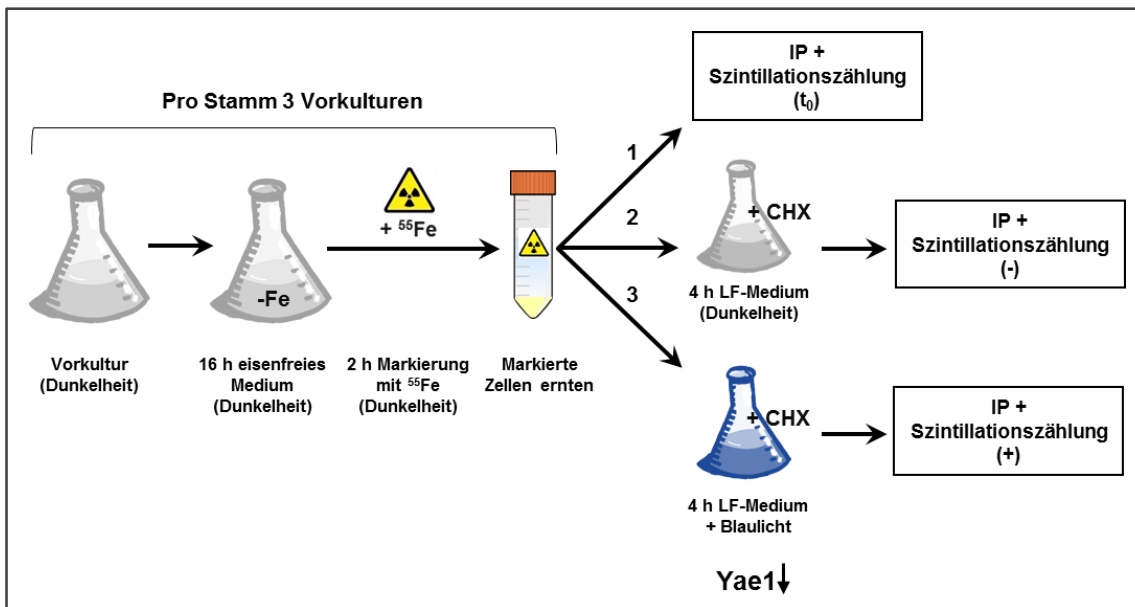


Abb. 2.27 Verfolgung der Fe-S Cluster-Stabilität durch die Kombination aus Markierung des Fe-S Proteins mit ^{55}Fe und lichtinduziertem Abbau von Zielproteinen. WT (W303a)- und Yae1-psd-Zellen (je 3 Kulturen) wurden unter Eisenmangel-Bedingungen (SC-Medium) in der Dunkelheit kultiviert und anschließend mit ^{55}Fe markiert. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese von Kultur 1 (t_0) wurde direkt durch Immunpräzipitation und Szintillationszählung bestimmt. Markierte Zellen der Kulturen 2 und 3 wurden mit H_2O gewaschen und mit LFM (*low fluorescence medium*) und Cycloheximid (CHX) versetzt. Es folgte eine zusätzliche 4-stündige Inkubation der Zellen in Dunkelheit (-) oder unter Bestrahlung mit Blaulicht (+). Die Stabilität der Fe-S Cluster in An- und Abwesenheit von Yae1 wurde durch Immunpräzipitation (IP) der Fe-S Proteine und anschließende Szintillationszählung bestimmt.

Sollte es sich bei Yae1 um einen Stabilisationsfaktor handeln, würde der Abbau von Yae1 durch die 4-stündige Inkubation in Blaulicht eine stark verminderte Radioaktivität des Rli1 im Vergleich zum Wildtyp oder der nicht-bestrahlten Kontrolle hervorrufen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Hingegen zeigte sich, dass sich die mit Rli1 und Leu1 assoziierte Radioaktivität in Blaulicht-bestrahlten und Kontroll-Zellen nicht unterschied (**Abb. 2.28 A, B**). Der Vergleich mit der Menge an Radioaktivität, die direkt nach der Markierung gemessen wurde (t_0) zeigte, dass sowohl in Rli1 als auch in Leu1 die Fe-S Cluster stabil mit dem Protein assoziiert waren.

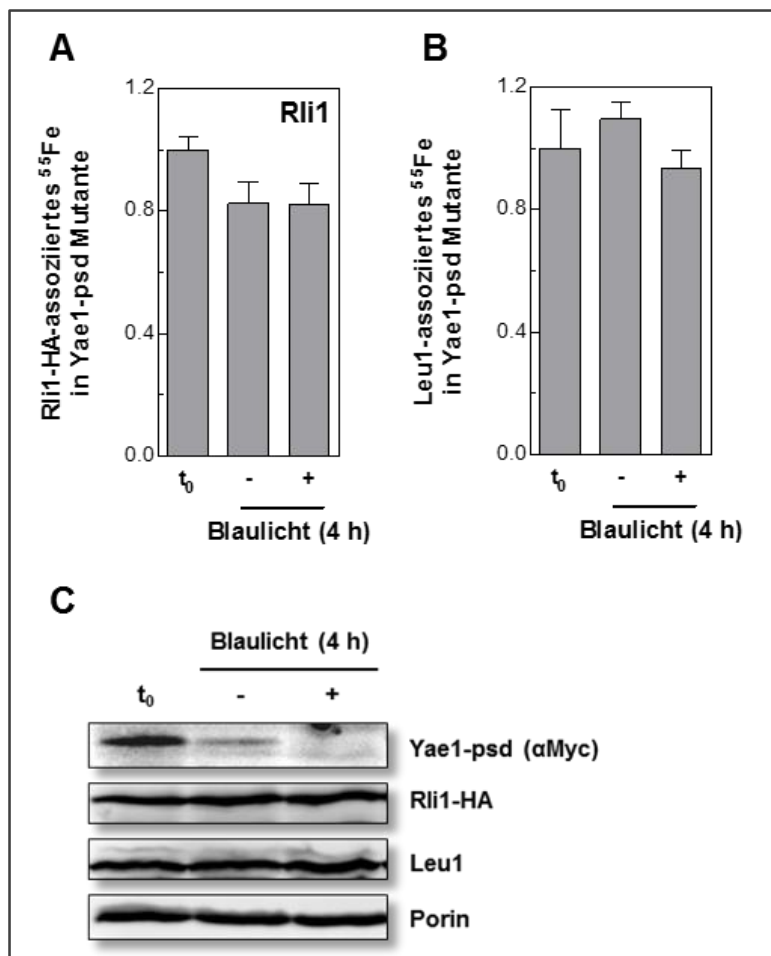


Abb. 2.28 Die Stabilität der Fe-S Cluster von Rli1 wird durch den lichtinduzierten Abbau von Yae1 nicht beeinträchtigt. (A,B) WT (W303a)- und Yae1-psd-Zellen (psd = photosensitive Domäne) wurden mit einem Plasmid zur Überexpression von Rli1-HA transformiert. Je drei Kulturen wurden 16 h in eisenarmen SC-Medium mit Glucose in der Dunkelheit kultiviert und anschließend für 2 h mit ^{55}Fe in der Dunkelheit markiert. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese von Kultur 1 (t_0) wurde durch Immunpräzipitation und Szintillationszählung bestimmt. Markierte Zellen der Kulturen 2 und 3 wurden mit H_2O gewaschen und mit 100 ml LF (*low fluorescence*)-Medium und Cycloheximid ($200 \mu\text{g} / \text{ml}$) versetzt. Es folgte eine zusätzliche 4-stündige Inkubation der Zellen in Dunkelheit (-) oder unter Bestrahlung mit Blaulicht (+; LED-Lampe 465 nm, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation der Zielproteine Rli1-HA und Leu1 mit HA-Sepharose oder an Protein A-Sepharose gekoppelten Leu1-Antikörpern und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität innerhalb der psd-Mutante wurde in Relation zur Radioaktivität im Wildtyp gesetzt. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Messungen an. **(C)** Der Nachweis der Menge der Fe-S Proteine erfolgte durch Immundetektion mit αHA - und αLeu1 Antikörpern. Das Yae1-psd-Fusionsprotein wurde mittels αMyc -Antikörper nachgewiesen. Porin diente als Ladekontrolle.

Durch eine Western Blot-Analyse wurde der vollständige Abbau des Yae1-Fusionsproteins in der Mutante bestätigt, wohingegen die Menge der Fe-S Proteine Rli1 und Leu1 nicht beeinträchtigt war (**Abb. 2.28 C**).

Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass die beiden Proteine Rli1 und Leu1 ihre Fe-S Cluster fest assoziiert haben und Yae1 keine Funktion als Stabilisator der Fe-S Cluster von Rli1 ausübt.

2.5.2 Yae1 und Lto1 fungieren auch unter anaeroben Bedingungen als spezifische Reifungsfaktoren für Rli1

Nachdem die Stabilität der Fe-S Cluster von Rli1 untersucht wurde und kein Unterschied in An- oder Abwesenheit von Yae1 festgestellt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass Yae1 (und Lto1) spezifische Reifungsfaktoren von Rli1 sind. Dies ist allerdings schwer zu vereinbaren mit der Beobachtung, dass Yae1 und Lto1 unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell sind (Snoek & Steensma, 2006). Um die Bedeutung beider Faktoren für die Fe-S Proteinbiogenese unter anaeroben Bedingungen zu klären, wurde die *de novo* ⁵⁵Fe-S Cluster-Bildung auf Rli1 anaerob analysiert. Dazu wurde Rli1 in Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen überexprimiert und die Zellen wurden gleichzeitig 46 h für Yae1 oder Lto1 unter anaeroben Wachstumsbedingungen depletiert. Nach der Markierung mit ⁵⁵Fe wurde die mit den Zielproteinen assoziierte Radioaktivität in den Yae1- und Lto1-depletierten Zellen mit der assoziierten Radioaktivität in Wildtyp- und Nbp35-depletierten Zellen verglichen (**Abb. 2.29**). Die Depletion von Yae1 und Lto1 führte zu einem ähnlichen Fe-S Cluster-Synthesedefekt von Rli1, wie auch nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35 (**Abb. 2.29 A**). Eine Western Blot-Analyse bestätigte dabei, dass lediglich die Fe-S Cluster-Synthese beeinträchtigt war und nicht die Proteinmenge von Rli1 (**Abb. 2.29 B**). Somit konnte durch den Einbau von ⁵⁵Fe in Rli1 unter anaeroben Bedingungen zweifelsfrei gezeigt werden, dass sich Yae1 und Lto1 wie Reifungsfaktoren verhalten. Im Falle einer Funktion als Stabilisationsfaktoren hätte man erwartet, dass sich die mit Rli1 assoziierte Radioaktivität unter anaeroben Bedingungen auch nach Depletion von Yae1 und Lto1 auf Wildtyp-Niveau hält, da keine oxidative Schädigung vorliegt.

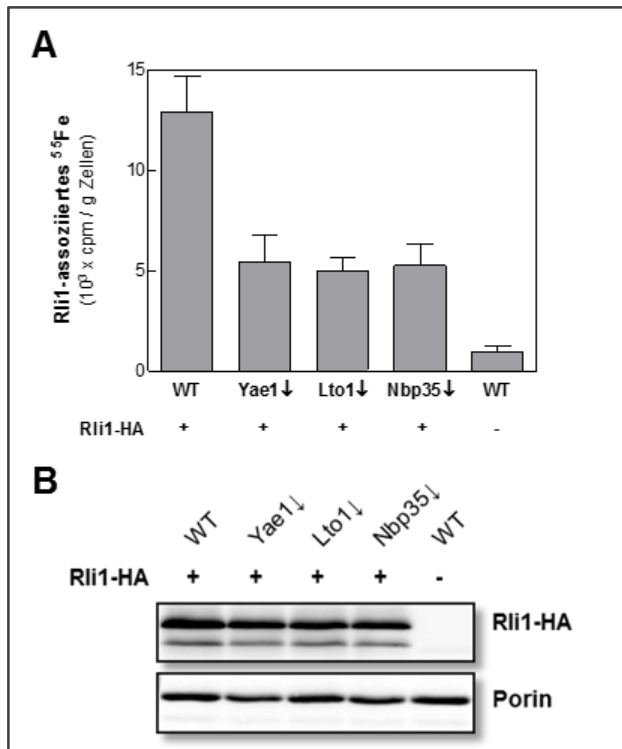


Abb. 2.29 Die Depletion von Yae1 und Lto1 führt auch unter anaeroben Bedingungen zu einem Reifungsdefekt von Rli1. (A) WT (W303a)-, Gal-YAE1-, Gal-LTO1- und Gal-NBP35-Zellen wurden mit einem Vektor zur Überexpression von Rli1-HA oder einem Leervektor transformiert. Die Zellen wurden 46 h unter anaeroben Bedingungen depletiert (SC-Medium mit Glucose) und davon 16 h in eisenarmen Minimalmedium kultiviert. Die Markierung mit ⁵⁵Fe erfolgte für 2 h unter anaeroben Bedingungen. Die *de novo* Fe-S Cluster-Synthese wurde durch Immunpräzipitation von Rli1-HA mit HA-Sepharose und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von drei unabhängigen Messungen an. (B) Der Nachweis der Proteinmenge von Rli1-HA erfolgte durch Immundetektion mit einem αHA Antikörper. Porin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend können Yae1 und Lto1 als spezifische Reifungsfaktoren des essentiellen ribosomalen Proteins Rli1 beschrieben werden. Die Beobachtung, dass beide Faktoren unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell sind, lässt sich damit erklären, dass die Funktion von Yae1 und Lto1 unter anaeroben Bedingungen zu einem bestimmten Grad umgangen wird, sodass eine basale, aber zum Überleben der Zelle ausreichende Menge von Holo-Rli1 gebildet werden kann.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden zwei Fe-S Cluster-koordinierende Cysteine des ersten und zweiten Motivs von Rli1 (Position 25 und 61, s. **Abb. 1.3**) entweder einzeln oder gleichzeitig zu Serinresten mutiert und das Wachstum der Zellen nach Expression der Mutanten in An- und Abwesenheit von Sauerstoff untersucht (**Abb. 2.30**).

Die Verwendung einer Tet-Rli1 Mutante als Hintergrundstamm erlaubte, die Expression des endogenen Rli1 durch Zugabe von Doxycyclin zu reprimieren. Damit konnte getestet werden, ob die beiden Fe-S Cluster von Rli1 sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen essentiell für die Funktion des Proteins sind.

Es konnte mit diesem Ansatz gezeigt werden, dass die gleichzeitige Mutation beider Fe-S Cluster-koordinierender Cysteine (C25S und C61S) unter beiden Wachstumsbedingungen letal für die Zelle war. Demgegenüber wurde unter anaeroben Bedingungen ein signifikantes Wachstum nach Expression der C25S- und C61S-Einzelmutanten beobachtet. Das zeigt, dass die Bildung eines durch Mutation labilisierten Fe-S Clusters von Rli1 unter anaeroben Bedingungen gerade noch ausreichend effizient ist, um die Funktion von Rli1 zu erhalten und das Wachstum der

Zelle zu gewährleisten. Werden allerdings beide Fe-S Cluster durch Mutationen labilisiert, so wird die Rli1 Funktion offensichtlich so stark beeinträchtigt, dass die Zelle nicht mehr effizient wachsen kann.

Aus diesen Daten erkennt man, dass unter anaeroben Bedingungen die Fe-S Cluster-Bindung noch effizient genug ist, um auch nach Mutation der Cysteinreste das Wachstum der Zelle zu erhalten. Für die Funktion von Yae1 und Lto1 bedeutet dies, dass die beiden Proteine zu einem gewissen Grad umgangen werden können, da unter anaeroben Bedingungen eine effizientere Bildung von Holo-Rli1 möglich ist.

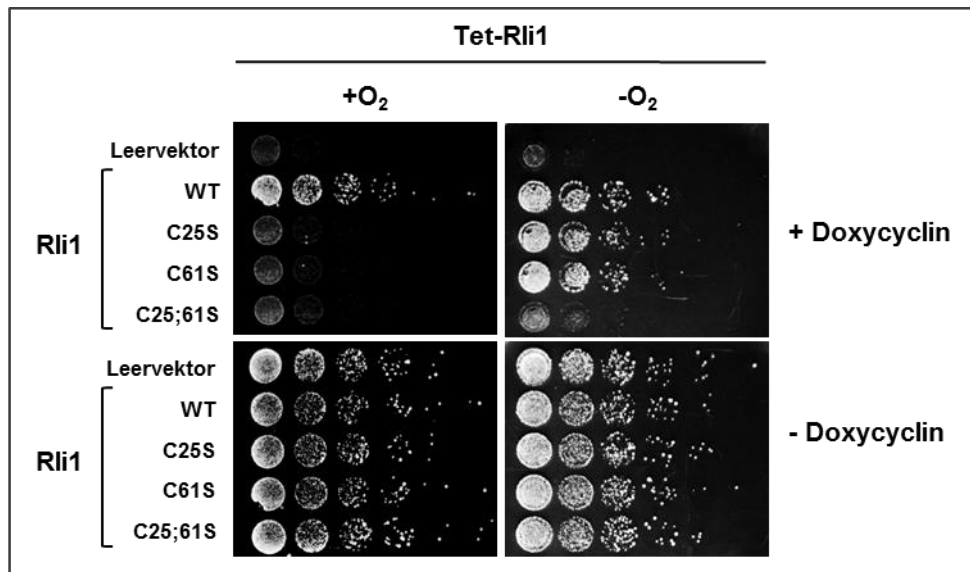


Abb. 2.30 Die Fe-S Cluster von Rli1 sind unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen kritisch für die Funktion. Tet-Rli1-Zellen wurden mit Vektoren zur Überexpression von Wildtyp- (WT) oder Cystein-zu-Serin-Mutanten von Rli1, sowie einem Leervektor transformiert. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des endogenen Promotors (300 bp stromaufwärts von *RLI1*). Die Zellen wurden 16 h kultiviert (SC-Medium mit Glucose), einmal in Sauerstofffreiem H₂O gewaschen und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert OD₆₀₀ = 0,5) anaerob auf Selektiv-Platten mit Glucose +/- 5 µg / ml Doxycyclin aufgebracht. Die Platten wurden drei Tage unter aeroben (+O₂) oder anaeroben (-O₂) Bedingungen bei 30 °C inkubiert.

Zusammengenommen konnte mit diesem Teil der Arbeit ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Funktion von Yae1 und Lto1 in Bezug auf den Fe-S Cluster-Einbau in Rli1 erbracht werden. Durch mehrere experimentelle Ansätze konnten beide Proteine als spezifische CIA-Reifungsfaktoren für Rli1, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen, charakterisiert werden. Dabei wurde ausgeschlossen, dass Yae1 (und vermutlich auch Lto1) eine Rolle bei der Stabilisierung der Fe-S Cluster von Rli1 ausführt und zu deren Schutz beiträgt.

2.6 Der humane YAE1D1-ORAOV1 Komplex fungiert ortholog zum Yae1-Lto1 Komplex der Hefe

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Komplex aus Yae1 und Lto1 in *S. cerevisiae* einen Teil der CIA-Maschinerie bildet, der spezifisch für die Reifung des hoch konservierten ribosomalen Proteins Rli1 benötigt wird. Eine BLAST-Analyse zeigte, dass die Yae1 und Lto1 Proteine Homologe in anderen eukaryotischen Spezies besitzen (siehe Multisequenzvergleiche im Abschnitt 8.3). Diese Proteine zeigen vor allem eine hohe Konservierung innerhalb der deka-GX₃-Domäne (vgl. **Abb. 2.10**). Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die humanen Proteine YAE1D1 und ORAOV1 ihre Hefehomologen Yae1 und Lto1 funktionell bei der Reifung des essentiellen Rli1 ersetzen könnten.

Die Konservierung des Yae1-Lto1 Komplexes sollte zunächst mittels eines Wachstumstests bestätigt werden. Dazu wurden Hefezellen für Yae1 und Lto1 depletiert und das Wachstum nach Überexpression der humanen Versionen (YAE1D1, ORAOV1) untersucht (**Abb. 2.31**). Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Überexpression des humanen YAE1D1 oder des ORAOV1 in Yae1- oder Lto1-depletierten Zellen nicht zu einer Komplementation des Wachstumsdefekts führte. Allerdings komplementierte die gleichzeitige Überexpression der humanen Homologen den Wachstumsdefekt sowohl in Yae1- als auch in Lto1-depletierten Hefezellen.

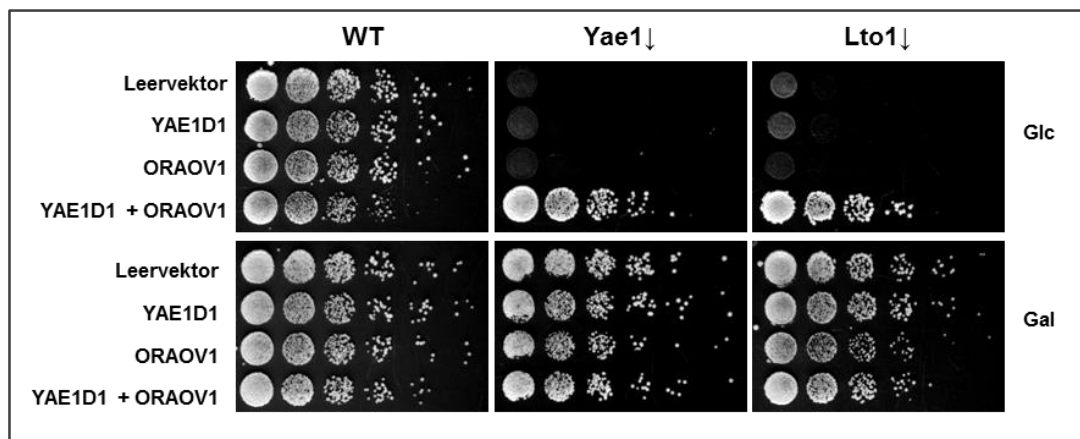


Abb. 2.31 Die Ko-Expression von YAE1D1 und ORAOV1 komplementiert den Wachstumsdefekt in Yae1- oder Lto1-depletierten Hefezellen. WT (W303a)-, Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen wurden mit Vektoren zur Überexpression von YAE1D1 und ORAOV1 oder mit einem Leervektor transformiert. Transformierte Zellen wurden 16 h in Minimalmedium mit Glucose kultiviert, um endogenes Yae1 und Lto1 zu depletieren und als serielle 1:5 Verdünnung (Anfangswert OD₆₀₀ = 0,5) auf Selektiv-Agarplatten mit Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) und entsprechenden Markern aufgebracht. Die Platten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Schließlich sollte untersucht werden, ob der humane YAE1D1-ORAOV1 Komplex auch die Funktion von Yae1/Lto1 bei der Reifung des Fe-S Proteins Rli1 übernehmen kann. Dazu wurden die Hefezellen 40 h für Yae1 und Lto1 depletiert und die Maturierung des Zielproteins Rli1 durch die Markierung mit ^{55}Fe in Anwesenheit der humanen Proteine untersucht (**Abb. 2.32**). Der Reifungsdefekt von Rli1 als Folge der Depletion von Yae1 oder Lto1, konnte nicht durch die Expression der einzelnen humanen Homologen komplementiert werden (**Abb. 2.32 A**). Jedoch wurde gezeigt, dass die Ko-Expression der humanen Proteine YAE1D1 und ORAOV1 den Fe-S Cluster-Synthesedefekt von Rli1 in Yae1- und Lto1-depletierten Hefezellen komplementieren kann (**Abb. 2.32 B**). Dieser Effekt war vergleichbar mit der Komplementation nach Plasmid-basierter Expression von Yae1 bzw. Lto1 alleine oder nach Ko-Expression der Hefe-Komplexparker. Vergleichbar mit den Beobachtungen zur Komplementation des Wachstumsdefektes von Yae1- und Lto1-depletierten Hefezellen (**Abb. 2.31**) konnte nur der humane Komplex aus YAE1D1 und ORAOV1 die Funktion der einzelnen Hefeproteine bei der Reifung des Fe-S Proteins Rli1 ersetzen. Die funktionell aktive Komponente bei diesem Prozess ist offensichtlich der Komplex aus Yae1 und Lto1 bzw. YAE1D1 und ORAOV1.

Zusammenfassend konnte mit dem letzten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden Rli1-spezifischen Reifungsfaktoren Yae1 und Lto1 konserviert sind und funktionell durch den humanen YAE1D1-ORAOV1 Komplex in der Hefe ersetzt werden können. Damit handelt es sich hierbei offensichtlich nicht um hefespezifische Proteine, sondern um generelle eukaryotische Faktoren.

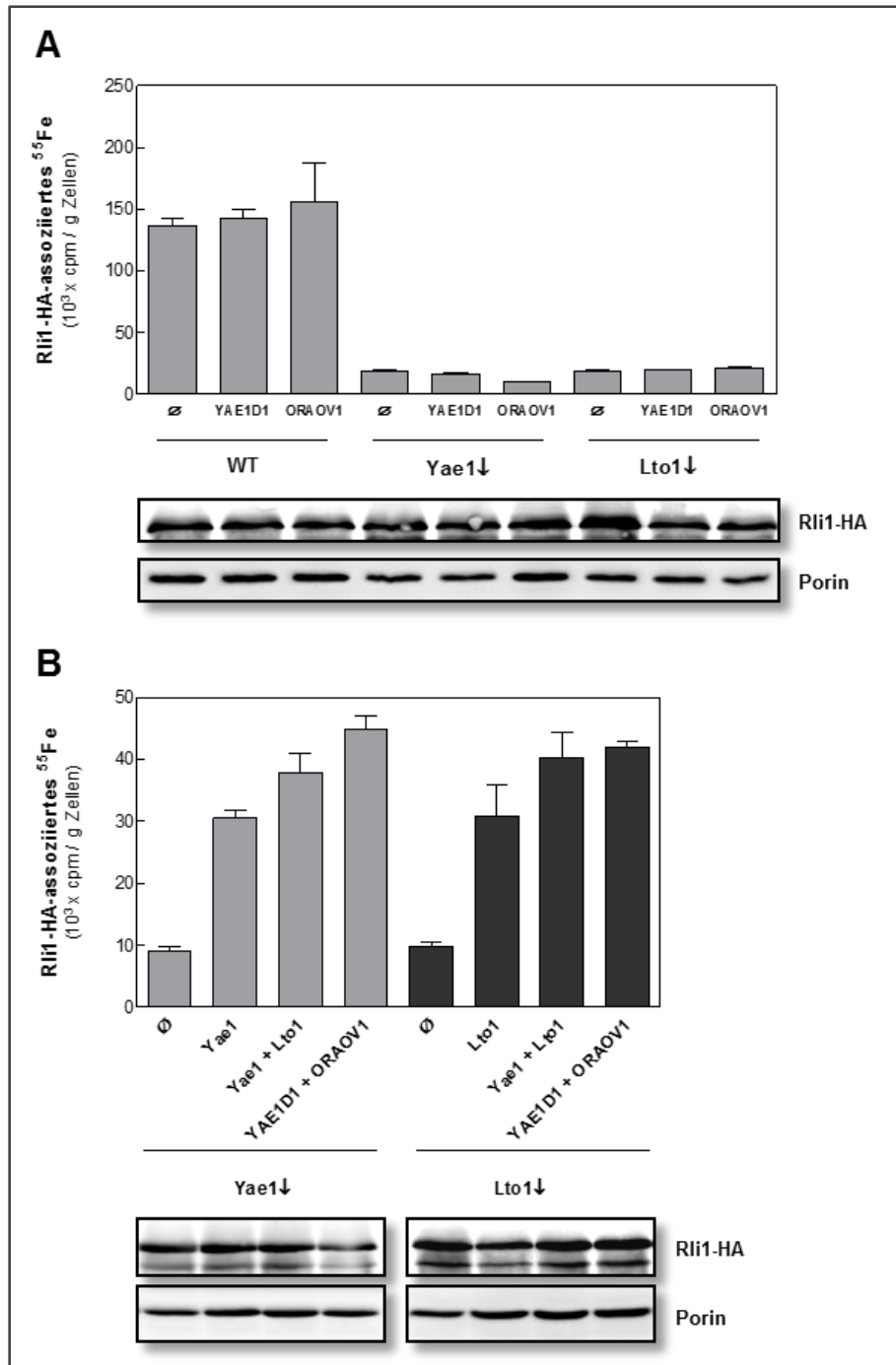


Abb. 2.32 Der humane YAE1D1-ORAOV1 Komplex ersetzt die Funktion des Yae1-Lto1 Komplexes bei der Reifung von Rli1 in der Hefe. (A) WT (W303a)-, Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen wurden mit einem Vektor zur Überexpression von Rli1-HA, sowie Vektoren zur Überexpression von YAE1D, ORAOV1 oder einem Leervektor ko-transformiert. Nach Depletion des endogenen Yae1 und Lto1 wurden die Zellen 16 h in eisenarmen Minimalmedium mit Glucose kultiviert und für 2 h mit ⁵⁵Fe markiert. Die *de novo* Fe-S Proteinsynthese wurde durch Immunpräzipitation des Rli1-HA mit HA-Sepharose und anschließende Szintillationszählung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde pro Gramm Zellen angegeben. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von mindestens vier unabhängigen Messungen an. Der Nachweis der Proteinmenge von Rli1-HA erfolgte durch Immundetektion mit einem αHA Antikörper. Der Nachweis von Porin diente als Ladekontrolle. **(B)** Gal-YAE1- und Gal-LTO1-Zellen wurden mit einem Vektor zur Überexpression von Rli1-HA und einem Leervektor oder Plasmiden zur Expression von Yae1, Lto1, sowie zur Überexpression des Yae1-Lto1 Komplexes bzw. des humanen YAE1D1-ORAOV1 Komplexes ko-transformiert. Kultivierung und Markierung mit ⁵⁵Fe und Bestimmung der *de novo* Fe-S Cluster-Synthese erfolgten wie unter (A).

3 Diskussion

Die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine basiert auf der Zusammenarbeit dreier komplexer Protein-Maschinerien: der mitochondrialen ISC-Assemblierungsmaschinerie, der ISC-Exportmaschinerie und der zytosolischen CIA-Maschinerie, deren weitere Aufklärung Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Mehrere im Nukleus lokalisierte und am DNA-Metabolismus beteiligte Proteine, sowie der zytosolische Translationsfaktor Rli1 benötigen Fe-S Kofaktoren für ihre Funktion. Die direkte Abhängigkeit der Reifung solcher essentieller Fe-S Proteine von der ISC-Assemblierungsmaschinerie in den Mitochondrien erklärt, dass dieser Prozess der eukaryotischen Zelle diese Organellen unabdingbar für das Leben macht. Die Tatsache, dass zwei so grundlegende Prozesse des Lebens wie die Translation und die DNA-Replikation auf der Funktion von Fe-S Proteinen basieren, könnte sich mit der Theorie einer Eisen-Schwefel-Welt vereinbaren lassen. Nach dieser Theorie ist das Leben auf der Erde an der Oberfläche von Eisen-Schwefel Mineralen entstanden (Wachtershauser, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hauptziele verfolgt. Zum einen sollte das CIA-Interaktom näher charakterisiert werden. Durch die in meiner Arbeit durchgeführte systematische Interaktionsstudie konnten die acht bereits bekannten CIA-Faktoren nun unterschiedlichen funktionellen Subkomplexen zugeordnet werden, die in verschiedenen Phasen der Fe-S Proteinbiogenese eine Rolle spielen (**Abb. 3.1**).

Zum anderen sollten neue Komponenten, die an diesem Reifungsprozess beteiligt sind, aufgefunden werden. Die beiden essentiellen Proteine Yae1 und Lto1 wurden entdeckt und als neue CIA-Faktoren charakterisiert. Beiden Faktoren kommt eine hoch spezifische Funktion bei der Reifung des ribosomalen Fe-S Proteins Rli1 zu (**Abb. 3.1**).

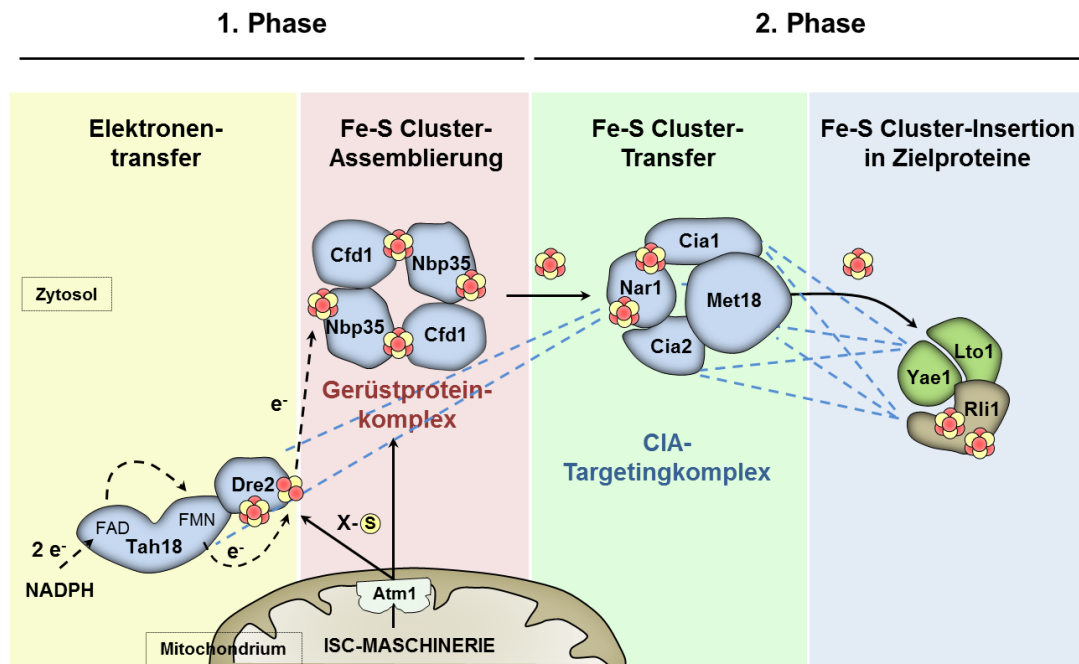


Abb. 3.1 Die zytosolische Fe-S Proteinbiogenese wird durch zwei Hauptschritte mit jeweils zwei Proteinkomplexen bewerkstelligt. Die Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine wird durch die acht bereits bekannten CIA-Faktoren ermöglicht und kann in zwei Phasen unterteilt werden, die jeweils zwei Subkomplexe beinhalten: 1. Assemblierung eines neuen Fe-S Clusters auf einem Gerüstproteinkomplex und 2. Transfer und Insertion des Fe-S Clusters in Apoproteine mithilfe des CIA-Targetingkomplexes. Im Modell sind interagierende CIA-Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit durch systematische Analyse und teils durch Ko-Immunpräzipitation detektiert wurden, in blau dargestellt. Die zugrunde liegenden Interaktionen wurden bereits in früheren Studien beobachtet und erlauben nun eine Einteilung der acht bekannten CIA-Faktoren, entsprechend ihrer Funktion, in drei Subkomplexe. Blaue Linien repräsentieren Interaktionen zwischen den einzelnen Subkomplexen, die erstmals in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten. Neben den bereits bekannten CIA-Faktoren erfordert die Reifung des 2[4Fe-4S]-Proteins Rli1 die zwei in dieser Arbeit neu entdeckten Reifungsfaktoren Yae1 und Lto1. Beide Faktoren interagieren sowohl miteinander, als auch mit dem CIA-Targetingkomplex und Rli1. Die Interaktion des CIA-Targetingkomplexes (Cia1, Cia2, Met18) mit dem Fe-S Protein Rli1 in der Hefe konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden.

3.1 Drei Subkomplexe innerhalb der CIA-Maschinerie erlauben die Maturierung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine

Zu Beginn meiner Arbeit war bekannt, dass die CIA-Maschinerie aus acht Proteinen besteht, deren Interaktionen durch einzelne Teilkomplexe beschrieben wurden: Cfd1-Nbp35, Dre2-Tah18, Nar1-Cia1, Nar1-Cia2, Cia1-Cia2, Cia1-Met18, Cia2-Met18 (Balk *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007; Krogan *et al.*, 2006; Netz *et al.*, 2013). Aufgrund erheblicher Defizite im Verständnis dieser Interaktionen und unter der Annahme, dass weitere bisher nicht aufgefundene Proteine eine Funktion in diesem komplexen Prozess haben, wurde das CIA-Interaktom in der vorliegenden Arbeit durch TAP-MS (Tandem-Affinitätsreinigung gekoppelt mit Massenspektrometrie) systematisch analysiert.

Nach computerbasierter Auswertung der Daten unter Verwendung des *SAINT* Algorithmus konnten die bereits bekannten Interaktionen zwischen Dre2-Tah18, Cia1-Cia2, Cia2-Nar1 und Cia2-Met18 bestätigt werden (**Abb. 3.1**). Diese Interaktionspaare wurden, mit Ausnahme von Cia2-Nar1, zusätzlich in der vorliegenden Arbeit durch Ko-Immunpräzipitationsversuche nachgewiesen (**Abb. 2.5** und **Abb. 2.6**). Nach dieser computerbasierten Auswertung der TAP-MS Daten konnten erstaunlicherweise die binären Interaktionen zwischen Cfd1-Nbp35, Nar1-Cia1 und Cia1-Met18 nicht gezeigt werden, obwohl es dafür aus früheren Studien bereits experimentelle und funktionelle Evidenz gab (Balk *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2002). Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen Beispielen um Interaktionen handelt, deren Nachweis, wie später in dieser Arbeit diskutiert, unter Verwendung des *SAINT* Algorithmus nicht gewährleistet werden konnte. Daher wurde das hier generierte Datenset neben der computerbasierten Analyse zusätzlich manuell ausgewertet.

Im Zuge dessen wurde gezielt nach CIA-Proteinen in den Tandem-Affinitätsreinigungen der jeweiligen CIA-Komponenten gesucht (**Tab. 2.2**). Ein Kriterium dabei war, dass das jeweilige Protein nicht in der Kontrollreinigung mit dem Wildtyp-Stamm SC0000 detektiert wurde. Dieser Stamm exprimiert kein TAP-Fusionsprotein. Proteine, die in der Massenspektrometrie unter Verwendung dieses Stammes gefunden wurden, wurden als generelle Kontaminationen erachtet. Mithilfe dieses Verfahrens gelang nun auch der Nachweis der aus früheren Studien bereits bekannten Interaktionen zwischen Cfd1-Nbp35, Nar1-Cia1 und Cia1-Met18. Zusätzlich konnten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Interaktionen zwischen den CIA-Faktoren Nar1-Dre2, Nar1-Tah18 und Nar1-Met18 gezeigt werden (**Abb. 3.1**).

Basierend auf diesen neu gewonnenen Erkenntnissen konnte ein CIA-Interaktionsmodell erstellt werden, in dem die einzelnen Faktoren, entsprechend ihrer Funktion, den zwei Phasen der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese zugeteilt werden (**Abb. 3.1**). Die erste Phase beinhaltet demnach die Cluster-Assemblierung auf dem Gerüstproteinkomplex Cfd1-Nbp35, der in meiner Arbeit durch die TAP-MS Methode nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte im Rahmen einer anderen Studie gezeigt werden, dass dieser Komplex einen labilen [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, der für den anschließenden Transfer auf Apoproteine vorgesehen ist (Netz *et al.*, 2012a). Dieser Schritt hängt zusätzlich von dem Fe-S Protein Dre2 und der Diflavinreduktase Tah18 sowie der in den Mitochondrien lokalisierten ISC-Maschinerie ab. Dre2 und Tah18 bilden einen stabilen Komplex, der in meiner Arbeit sowohl durch TAP-MS, als auch durch Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden konnte. Wie in einer anderen Studie gezeigt wurde, erlauben die CIA-Faktoren Dre2 und Tah18 den Transfer

von Elektronen ausgehend von NADPH und sind damit auch grundlegend an der Reifung des Gerüstproteins Nbp35 beteiligt (Netz *et al.*, 2010).

Die zweite Phase beinhaltet den Transfer des neu assemblierten Fe-S Clusters sowie die folgende Insertion in Apoproteine und wird durch den CIA-Targetingkomplex ermöglicht. Wie in der vorliegenden Arbeit durch TAP-MS und Ko-Immunpräzipitationsversuche gezeigt wurde, setzt sich dieser aus Cia1, Cia2 und Met18 zusammen. Er vermittelt den direkten Kontakt mit Fe-S Zielproteinen. Diese Funktion konnte im Rahmen meiner Arbeit durch den Nachweis der Interaktion zwischen Cia1, Cia2 und Met18 und dem Fe-S Protein Rli1 mittels TAP-MS erstmals in der Hefe gezeigt werden. Der genaue Mechanismus dieses Cluster-Transfers und Einbaus in Zielproteine ist jedoch bisher nicht bekannt. Womöglich fungiert Cia1 aufgrund seiner Struktur als eine Plattform für die Zusammensetzung des trimeren CIA-Targetingkomplexes.

Nar1 nimmt in diesem Prozess eine intermediäre Stellung ein und kann keinem der drei CIA-Subkomplexe eindeutig zugeordnet werden. Die Interaktion von Nar1 mit Cia1 und Cia2 war zu Beginn meiner Arbeit bereits bekannt (Balk *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2007). Jedoch ergab meine systematische Interaktionsstudie zusätzlich eine bisher nicht bekannte Verbindung zum dritten Faktor des CIA-Targetingkomplexes, Met18, und zu den Komponenten der Elektronentransportkette Dre2 und Tah18. Die letztgenannten Interaktionen konnten während der Anfertigung meiner Arbeit überdies im Rahmen einer anderen Untersuchung durch Affinitätsreinigung und anschließende Western Blot-Analyse bestätigt werden (Netz *et al.*, 2010). Die mechanistische Aufklärung der Interaktion von Nar1 mit den Komponenten der CIA-Elektronentransportkette wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Für die zukünftige Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese, werden zudem strukturelle Analysen der einzelnen CIA-Komponenten erforderlich sein. Der direkte Vergleich mit der Fe-S Cluster-Assemblierung in den Mitochondrien lässt vermuten, dass vor allem am Transfer und der Insertion des Fe-S Clusters in Zielproteine noch weitere bisher unbekannte Komponenten beteiligt sind. Dies könnten z.B. Chaperone sein, die auch die entsprechenden Konformationsänderungen während der Cluster-Insertion erlauben. Solche Chaperonproteine sind allerdings auf dem Feld der Fe-S Proteinbiogenese noch nicht beschrieben.

Die enge Interaktion zweier CIA-Faktoren konnte indirekt auch dadurch nachgewiesen werden, dass ein bestimmtes CIA-Protein depletiert wurde und die Menge der anderen CIA-Faktoren durch Immunofärbung bestimmt wurde (**Abb. 2.7** und **2.8**). Kürzlich wurde

solch ein experimenteller Ansatz von Fabien Pierrel verwendet, um die Coq-Proteine 1-9 und deren Rolle bei der Biosynthese von Koenzym Q (Ubiquinon) zu untersuchen (Xie *et al.*, 2012). Es wurde gezeigt, dass die Deletion eines einzelnen Coq-Faktors den gesamten für die Biosynthese von Q₆ benötigten Superkomplex in der Hefe labilisieren kann, und zu einem Abbau von Coq4, Coq6, Coq7 und Coq9 führt, womit die Abhängigkeit der einzelnen Faktoren voneinander demonstriert wurde. Unter Verwendung von Gal-CIA-Mutanten wurde in der hier vorliegenden Arbeit nun die Expression jedes einzelnen CIA-Faktors reprimiert und die Proteinmenge der anderen CIA-Faktoren in Relation zur Wildtyp-Zelle untersucht. Global betrachtet konnte gezeigt werden, dass die Depletion eines Faktors die Menge seiner Subkomplexpартner meist verringert und damit zu einer Labilisierung des jeweiligen Komplexes führt (**Abb. 3.2**). Überdies wurde durch Depletion eines früh agierenden CIA-Faktors die Verminderung der Proteinmenge später CIA-Faktoren gezeigt. Besonders auffällig war, dass die Proteinmenge des Fe-S Proteins Nar1 durch Depletion aller vier frühen Faktoren (Dre2, Tah18, Cfd1, Nbp35) deutlich verringert wurde. Die späten Faktoren Cia1, Cia2 und Met18 hingegen, die keinen Fe-S Cluster koordinieren, waren unter diesen Depletionsbedingungen stabil. Dies lässt sich mit der nicht mehr möglichen Fe-S Cluster-Bildung auf Nar1 nach Depletion dieser vier frühen CIA-Faktoren erklären, die den Abbau des Proteins nach sich zieht. Demgegenüber hatte die Depletion von Cia1, Cia2 und Met18 umgekehrt keinen Einfluss auf die Nar1 Proteinmenge. Erneut kann damit die intermediäre Stellung dieses Faktors belegt und generell der sequentielle Charakter der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese demonstriert werden.

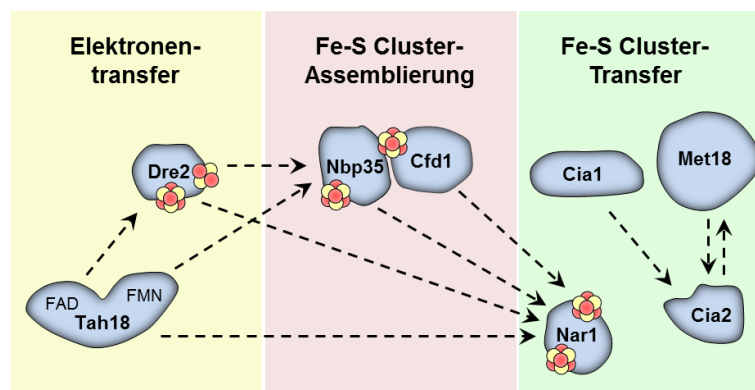


Abb. 3.2 Frühe CIA-Faktoren können die Proteinmenge später CIA-Faktoren in der Hefe beeinflussen. Mithilfe eines Depletionsexperimentes wurde je ein CIA-Faktor depletiert und die Proteinmenge der übrigen Faktoren durch Western Blot-Analyse bestimmt. Gebrochene Linien repräsentieren einen destabilisierenden Effekt des depletierten Faktors (Pfeilende) auf einen anderen CIA-Faktor (Pfeilspitze). Die Depletion der frühen Faktoren Dre2, Tah18, Cfd1 (und Nbp35) führt zu einer Abnahme der Menge der Fe-S Cluster-koordinierenden Faktoren Nar1 und Nbp35, die sich mit der nicht mehr möglichen Kofaktor-Bildung und der damit einhergehenden Destabilisierung der Proteine erklären lässt.

Die in meiner Arbeit gezeigte Destabilisierung des CIA-Targetingkomplexes in der Hefe nach Depletion von Cia1, Cia2 oder Met18 lässt sich überdies mit neuesten Beobachtungen im humanen System vereinbaren. Unter Verwendung von RNAi konnte hierbei der gleiche destabilisierende Effekt auf den ganzen CIA-Targetingkomplex beobachtet werden, sobald eine der drei Komponenten (CIA1, CIA2B oder MMS19) depletiert wurde (Stehling *et al.*, 2013). Durch diese Untersuchung am humanen System wurde unter anderem auch die unterschiedliche Funktion der beiden Cia2 Homologe, CIA2A und CIA2B, belegt. Während die Depletion von CIA2B die Proteinmenge von CIA1 und MMS19 drastisch verringerte, führte die Depletion von CIA2A zu keiner Verringerung von CIA1, CIA2B oder MMS19. Die humanen Faktoren CIA1, CIA2B und MMS19 stabilisieren sich demnach gegenseitig durch die Bildung des CIA-Targetingkomplexes. Dies ist vergleichbar zur Komplexbildung in der Hefe.

3.2 Der CIA-Targetingkomplex vermittelt den Kontakt zu Apoproteinen

Ein zusätzliches Ziel der systematischen Interaktionsstudie von bekannten CIA-Faktoren war die Identifizierung weiterer zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine. Ein solches globales Protein-Interaktionsnetzwerk wurde zeitgleich in einer anderen Studie für die humanen CIA-Faktoren CIA1, CIA2A, CIA2B und MMS19 generiert (Gari *et al.*, 2012; Stehling *et al.*, 2013; Stehling *et al.*, 2012). Dazu wurden HA-FLAG-fusionierte CIA-Faktoren aus HEK293 Zellen isoliert und Interaktionspartner durch Massenspektrometrie detektiert. Neben den bekannten CIA-Interaktionspartnern konnte mit dieser Methode eine Vielzahl von Fe-S Zielproteinen aufgefunden werden, darunter u.a. die Polymerasen POLA1, POLD1 und POLE, sowie der Translationsfaktor ABCE1 (Homolog des Hefe Rli1). Im Rahmen der Analyse wurde der trimere Komplex aus CIA1, CIA2A/CIA2B, MMS19 als „CIA-Targetingkomplex“ definiert, der den direkten Kontakt mit Apoproteinen ermöglicht und den Transfer des Fe-S Clusters und die anschließende Insertion in diese erlaubt. Es konnte damit auch gezeigt werden, dass sich die späten CIA-Faktoren durch eine hohe Substratspezifität für bestimmte Zielproteine auszeichnen und nicht immer die gleiche Kombination an Reifungsfaktoren für jedes Fe-S Protein benötigt wird.

Die Analyse des CIA-Interaktoms in der Hefe erlaubte erstmals den Nachweis der Interaktionen zwischen Cia1, Cia2, Met18 und dem Fe-S Protein Rli1 (**Abb. 3.1**). Somit geht man davon aus, dass die Funktion des CIA-Targetingkomplexes auch in der Hefe die Vermittlung des Kontaktes zu Apoproteinen und die anschließende Insertion des Fe-S Clusters in diese ist. Im Vergleich zum humanen System war jedoch der Nachweis von Interaktionen zwischen spät agierenden CIA-Faktoren und Fe-S Proteinen mittels

Tandemaffinitätsreinigung weniger erfolgreich. Obwohl aus früheren Studien bereits bekannt war, dass vor allem der CIA-Faktor Met18 vielfältige Interaktionen mit Fe-S Proteinen eingeht (Rad3, Chl1, Dna2, Pol3), konnte keine dieser Wechselwirkungen, in dem hier generierten Datenset gezeigt werden (Chanet & Heude, 2003; Collins *et al.*, 2007; Stehling *et al.*, 2012). Lediglich die oben genannte Interaktion mit Rli1 wurde detektiert. Man muss somit von einem Detektionsproblem durch Verwendung eines nicht optimalen Auswertungsalgorithmus ausgehen. Im folgenden Abschnitt werden mögliche Gründe für das Nicht-Auffinden solcher bereits bekannten Interaktionen diskutiert.

3.3 Die systematische Interaktionsanalyse eignet sich nur bedingt für die Aufklärung der CIA-Wechselwirkungen

Wie bereits erwähnt, konnten Wechselwirkungen innerhalb der CIA-Maschinerie und die Interaktionen von CIA-Faktoren und Fe-S Zielproteinen durch die systematische Interaktionsstudie nicht vollständig nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt sich mit der generellen Begrenzung der verwendeten Technologie begründen. Darunter sind zum einen das Detektionslimit und zum anderen eine Beeinträchtigung der Funktion bzw. Stabilität untersuchter Faktoren zu nennen. Letzteres kann sich durch die Fusion der Proteine mit einem Affinitätsmarker ergeben.

CIA-Faktoren sind niedrig abundante Proteine mit < 6000 Molekülen pro Zelle (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Ein Nachweis solcher Proteine in systematischen Interaktionsstudien ist durch die Überlagerung mit hoch abundanten Faktoren erschwert. Ribosomale Proteine, sowie Chaperone oder Komponenten des Proteasoms werden als allgemeine Kontaminationen dieser Methode erachtet und machen mit jeweils bis zu 300.000 Kopien einen Großteil der Proteine innerhalb der Hefezelle aus. Aufgrund ihrer natürlichen Funktionen interagieren diese Proteine mit einer Vielzahl verschiedener Faktoren und erschweren damit die systematische Analyse von niedrig abundanten Proteinen. Auch in meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich solche Faktoren über dem gewählten Grenzwert absetzen und als Interaktionspartner erscheinen, obwohl davon auszugehen ist, dass diese Interaktionen nicht spezifisch sind (**Abb. 2.3**).

Ein weiterer Grund für das Fehlen bekannter Interaktionen in meinem Datenset könnte die C-terminale Fusion der CIA-Faktoren mit dem TAP-Tag sein. Dieser mit 20 kDa verhältnismäßig große Affinitätsmarker könnte die Interaktion mit anderen Faktoren und damit auch die Funktion der CIA-Proteine selbst beeinträchtigen. Dies lässt sich beispielhaft mit den beiden P-loop NTPasen Cfd1 und Nbp35 beschreiben. Es war zu Beginn meiner Arbeit bekannt, dass beide Faktoren miteinander interagieren und einen Gerüstproteinkomplex für die Assemblierung zytosolischer Fe-S Cluster bilden

(Hausmann *et al.*, 2005; Netz *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2003). Durch *in vitro* und *in vivo* Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass die beiden zentralen Cysteine am C-Terminus von Cfd1, sowie Nbp35 essentiell für die Assemblierung extra-mitochondrialer Fe-S Proteine, sowie für die Stabilisierung des Cfd1-Nbp35 Komplexes sind (**Abb. 1.7**) (Netz *et al.*, 2012a). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass diese Aminosäurereste für die Koordination eines verbrückenden, labilen [4Fe-4S]-Clusters zwischen Homo- bzw. Heterodimeren aus Cfd1 und Nbp35 verantwortlich sind (**Abb. 3.3**). Durch die Fusion des C-Terminus von Cfd1 und Nbp35 mit dem TAP-Tag schafft man womöglich eine Situation, in der die Funktion beider Faktoren nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Dies wiederum würde erklären, warum die Interaktion von Cfd1 und Nbp35 unter Verwendung der TAP-MS Methode nur unzureichend nachgewiesen werden konnte.

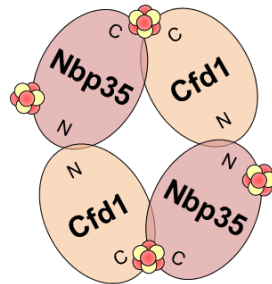


Abb. 3.3 Der CIA-Gerüstproteinkomplex aus Cfd1 und Nbp35. Die beiden Gerüstproteine koordinieren einen labilen, verbrückenden [4Fe-4S]-Cluster mithilfe ihrer Cystein-Motive am C-Terminus. Zusätzlich zeichnet sich Nbp35 durch einen weiteren [4Fe-4S]-Cluster am N-Terminus aus. Modifiziert nach (Netz *et al.*, 2012a).

Ein genereller negativer Einfluss des TAP-Tags auf die Expression bzw. Stabilität der hier untersuchten CIA-Proteine konnte im Rahmen meiner Arbeit jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden. So gelang in allen Fällen der Nachweis der Expression der CIA-TAP-Fusionsproteine im Zellextrakt (**Abb. 2.2 B**). Es zeigte sich allerdings eine gewisse Destabilisierung der Cfd1-, Dre2-, und Nar1-Fusionsproteine nach Proteolyse und erfolgter Tandem-Affinitätsreinigung. Durch Western Blot-Analyse der finalen Eluate wurde bestätigt, dass diese Fusionsproteine nun partiell abgebaut waren (**Abb. 2.2 C**).

Ein weiterer Grund für den erschwerten Nachweis von CIA-Interaktionen nach systematischer Analyse könnte der vermeintlich transiente Charakter dieser Wechselwirkungen in der Hefe sein. Um dieses Problem zukünftig zu umgehen, könnte man die Komplexe durch ein *Crosslinking*-Verfahren fixieren, um sie anschließend massenspektrometrisch zu analysieren. Die Annahme, dass es sich bei den gesuchten Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie um recht schwache Wechselwirkungen handelt, wurde in meiner Arbeit unter anderem durch die Ko-Immunpräzipitationsanalyse

bestätigt (**Abb. 2.5**). Mit diesem Ansatz konnten nur verhältnismäßig starke Wechselwirkungen, z.B. zwischen Dre2 und Tah18 und zwischen den Komponenten des CIA-Targetingkomplexes (Cia1-Cia2-Met18), detektiert werden. Dies deckt sich mit dem Nachweis derselben Interaktionen nach computerbasierter Analyse der Massenspektrometriedaten (**Abb. 2.3**). Um die transienten Interaktionen innerhalb der CIA-Maschinerie und deren Dynamik zukünftig besser zu verstehen, werden Änderungen der Versuchsdurchführung notwendig sein. Eine Variation der Pufferkomponenten, z.B. eine Verringerung der Salzkonzentration, ist dabei nur eine Option von vielen.

Um transiente Interaktionen zwischen CIA-Faktoren und Zielproteinen innerhalb der Hefezelle zukünftig nachzuweisen, wäre denkbar, das Interaktionsprofil später Faktoren mit Fe-S Zielproteinen bei gleichzeitiger Depletion eines frühen Faktors, z.B. Cfd1 oder Nbp35, zu untersuchen. Durch die Depletion eines frühen Faktors könnten die dynamischen Interaktionen der CIA-Maschinerie verschoben werden, wodurch der normale Fluss der zytosolischen Fe-S Proteinbiogenese beeinträchtigt ist. Möglicherweise führt dies zu einer stabileren Komplexbildung zwischen späten CIA-Faktoren und den Zielproteinen, die unter diesen Umständen nicht maturiert werden können.

Aufgrund der geschilderten Begrenzungen von systematischen Interaktionsanalysen, war es in meiner Arbeit notwendig, gezielt eine Vielfalt von Interaktionsstudien zu kombinieren, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen.

3.4 Yae1 und Lto1 sind neue CIA-Interaktionspartner

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung weiterer Faktoren, die an der Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine in der Hefe beteiligt sein könnten. Durch die systematische Analyse von Interaktionspartnern der acht bekannten CIA-Faktoren und durch manuelle Datenauswertung wurden die Proteine Yae1 und Lto1 erstmals in dieser Arbeit als Interaktionspartner der späten CIA-Faktoren Cia1, Cia2 und Met18 detektiert (**Abb. 3.1**). Diese Interaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich durch Ko-Immunpräzipitationsversuche bestätigt und eine physiologische Relevanz derselben durch die in einer früheren Studie gemachte Beobachtung bestärkt, dass beide Proteine sowohl miteinander, als auch mit dem Fe-S Protein Rli1 interagieren (Krogan *et al.*, 2006).

Zu Beginn meiner Arbeit waren beide Proteine funktionell nicht näher charakterisiert. Jedoch war bereits bekannt, dass Yae1 und Lto1 zu einer Gruppe von 65 *S. cerevisiae* Proteinen gehören, die unter aeroben, nicht aber unter anaeroben

Wachstumsbedingungen essentiell sind (Snoek & Steensma, 2006). Der Grund für diese Beobachtung war unklar.

Eine Verwandtschaft beider Proteine wird überdies durch eine bioinformatische Betrachtung der Sequenzen deutlich. Beide Proteine zeichnen sich durch eine N-terminal gelegene Yae1-N-Domäne aus, die auch in den humanen Homologen zu finden ist (**Abb. 2.10**). Diese Domäne enthält bis zu zehn konservierte Glycinreste, die jeweils durch drei Aminosäuren voneinander getrennt angeordnet sind (deka-GX₃-Domäne). Aufgrund dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass Yae1 und Lto1 eine ähnliche Funktion in der Zelle ausüben. Denkbar wäre, dass sie als Heterodimer fungieren, der über die α -helikale deka-GX₃-Domäne zusammengehalten wird. Zukünftige Studien werden notwendig sein, um die Funktion dieser besonderen Domäne und ihre vermeintliche Rolle bei der Dimerisierung aufzuklären. Yae1 und Lto1 sind die einzigen Beispiele eukaryotischer Proteine, die eine solche Domäne enthalten. Ein ähnliches Motiv wurde jedoch bereits für das bakterielle Protein FliH beschrieben (Trost & Moore, 2009). FliH hat eine nicht näher definierte Funktion beim Export der Komponenten des bakteriellen Flagellums aus dem Zytoplasma und bildet ein FliH₂-FliI Heterotrimer. FliI ist eine Walker-ATPase und ordnet sich zu einem homohexameren Ring an, um seine ATPase Aktivität auszuüben (Claret *et al.*, 2003; Fan & Macnab, 1996; Minamino *et al.*, 2006). Die Rolle der deka-GX₃-Domäne in FliH ist jedoch ebenfalls ungeklärt.

Diese Komponenten des bakteriellen Flagellums zeigen eine starke Homologie zu Proteinen des TypIII-Sekretionssystems Gram-negativer pathogener Bakterien, die damit Virulenzfaktoren direkt in die eukaryotische Wirtszelle injizieren (Macnab, 2004; Minamino *et al.*, 2008; Minamino & Namba, 2004). Die TypIII-Sekretionsfaktoren YscL, AscL und PscL sind Homologe des FliH mit hoher Konservierung der Glycin-reichen Domäne. Diese starke Konservierung lässt auf eine wichtige strukturgebende oder biologische Funktion dieser seltenen Domäne schließen und war daher Gegenstand einer früheren systematischen Studie zur Charakterisierung dieser Glycin-reichen Wiederholungen in FliH und seinem Homolog YscL (Trost & Moore, 2009).

Ein Sequenzvergleich der drei Aminosäurereste X innerhalb der GX₃-Wiederholungen der eukaryotischen Yae1-N Proteine und der bakteriellen Homologen bestätigt die Ähnlichkeit dieser Motive (**Abb. 3.4**). So findet man an Position 1 in den meisten Fällen einen unpolaren, hydrophoben Aminosäurerest. In 45 % der Fälle befindet sich an dieser Stelle ein Phenylalanin oder Tyrosin, in 15 % der Fälle ein Leucinrest. Damit unterscheidet sich diese Position deutlich von den Positionen 2 und 3, die eine vergleichbare Präferenz für die Besetzung dieser Stelle mit Glutaminsäure aufzeigen. Man geht somit davon aus, dass die Aminosäure an Position 1 eine fundamental

unterschiedliche Rolle als die Aminosäuren an den Positionen 2 und 3 spielt. Es wird vorgeschlagen, dass der Aminosäurerest an Position 1 Helix-Helix-Interaktionen vermittelt, wohingegen die Reste an Position 2 und 3 für die Aufrechterhaltung der helikalen Stabilität vonnöten sind (Troost & Moore, 2009).

Von besonderem Interesse für unsere Arbeit wird die zukünftige Aufklärung der strukturellen und funktionellen Bedeutung dieser seltenen Motive in Yae1 und Lto1 sein. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob die Funktion der deka-GX₃-Domäne dieser eukaryotischen Faktoren mit einer Funktion des Glycin-reichen Motivs innerhalb des bakteriellen FliH vergleichbar ist.

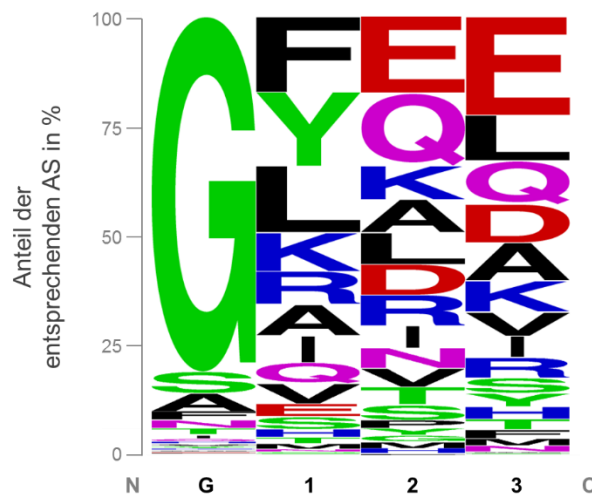


Abb. 3.4 Aminosäurenverteilung innerhalb der GX₃-Motive von pro- und eukaryotischen Proteinen. Zur Bestimmung der bevorzugten Aminosäurereste (AS) an den Positionen 1, 2 und 3 innerhalb des deka-GX₃-Motivs wurde ein Multisequenzvergleich der einzelnen Wiederholungen der Proteinfamilie pfam09811 durchgeführt und ein *Weblogo* (Weblogo.berkeley.edu) erstellt (Crooks *et al.*, 2004). Die Aminosäure an Position 1 hat vermutlich eine andere strukturelle Funktion als die Aminosäuren an den Positionen 2 und 3.

3.5 Yae1 und Lto1 sind neue CIA-Faktoren mit einer hohen Spezifität für das Fe-S Protein Rli1

Die physiologische Relevanz der neu entdeckten Interaktionen zwischen Yae1 bzw. Lto1 und dem CIA-Targetingkomplex sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden. Aufgrund der in einer anderen Studie bereits beschriebenen Interaktion von Yae1 und Lto1 mit dem Fe-S Protein Rli1 war eine Funktion bei der Biogenese zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine wahrscheinlich (Krogan *et al.*, 2006).

Durch die Markierung der Zelle mit ⁵⁵Fe und Aktivitätsmessungen von Fe-S Cluster-koordinierenden Enzymen wurde die Reifung bekannter zytosolischer und nukleärer Fe-S Zielproteine nach Depletion von Yae1 oder Lto1 bestimmt (**Abb. 2.20**, **Abb. 2.21**, **Abb. 2.22**). Dabei stellte sich überraschend heraus, dass die Depletion beider

Faktoren lediglich einen Reifungsdefekt des Fe-S Proteins Rli1 hervorruft. Demgegenüber wurden die im Nukleus lokalisierten Fe-S Proteine Rad3, Ntg2 und Pol3 oder die Untereinheit der Sulfid Reduktase, Ecm17, unabhängig von Yae1 und Lto1 maturiert. Mithilfe dieser Untersuchung konnten Yae1 und Lto1 als spezifische Reifungsfaktoren für Rli1 charakterisiert werden (**Abb. 3.1**). Ein weiteres zytosolisches Reporterprotein in dieser Analyse war das Enzym Leu1, das einen Schritt in der Biosynthese von Leucin katalysiert. Es zeigte sich, dass die Depletion von Yae1 und Lto1 zu einem leichten Reifungsdefekt dieses Fe-S Proteins im Vergleich zur Wildtyp-Zelle führte (**Abb. 2.20 B**). Dieser Defekt war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie nach Depletion des CIA-Faktors Nbp35. Eine zusätzliche Enzymaktivitätsmessung bestätigte, dass es sich bei dieser Beobachtung wohl um einen nicht spezifischen Reifungsdefekt handelte (**Abb. 2.21**). Durch die Bestimmung der Leu1 Aktivität konnte gezeigt werden, dass die Depletion des CIA-Faktors Nbp35 zu einer drastischen Verringerung der Aktivität führte, wohingegen sich die Aktivität von Leu1 nach Depletion von Yae1 oder Lto1 annähernd auf Wildtyp-Niveau hielt. Der Leu1 Reifungsdefekt, den man durch Markierung mit ^{55}Fe beobachtete, lässt sich wahrscheinlich mit einem sekundären Effekt erklären. Es ist denkbar, dass die Depletion von Yae1 und Lto1 einen indirekten Einfluss auf die Eisenbindung von Leu1 verursacht, da dieses Zielprotein einen sehr empfindlichen Fe-S Cluster koordiniert.

Durch Ko-Immunpräzipitationsversuche konnten die Funktionen von Yae1 und Lto1 als spät agierende CIA-Faktoren zusätzlich bestätigt werden (**Abb. 2.11**). Während der Nachweis der Interaktion zwischen Yae1 oder Lto1 und dem CIA-Targetingkomplex im Wildtyp-Hintergrund vermeintlich durch die Dynamik innerhalb der Hefezelle erschwert war, konnten die Komplexe durch Depletion des frühen CIA-Faktors Nbp35 stabilisiert werden (**Abb. 2.11**). Die Ko-Expression von Yae1 und Lto1 in der Nbp35-depletierten Zelle führte, unabhängig davon, welcher Faktor präzipitiert wurde, zur Ko-Präzipitation der späten CIA-Faktoren Cia1, Cia2 und Met18. Dasselbe Ergebnis wurde nach Präzipitation von Yae1 alleine beobachtet. Nach alleiniger Expression von Lto1 in der Nbp35-depletierten Zelle konnte jedoch keiner der späten CIA-Faktoren ko-präzipitiert werden. Dies lässt sich gegebenenfalls mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der beiden Faktoren zu dem CIA-Targetingkomplex erklären. Denkbar wäre, dass nicht beide Proteine gleichzeitig mit den CIA-Faktoren interagieren, sondern einer der beiden Faktoren, hier Yae1, eine Mediatorfunktion hat.

Analog dazu wurde vor kurzem in einer anderen Studie ein solcher verbrückender Charakter des Yae1 Proteins im trimeren Komplex aus Yae1, Lto1 und Rli1 beschrieben (Zhai *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von Lto1 analysiert und

eine Rolle bei der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit und der Initiation der Translation in Anwesenheit von Sauerstoff postuliert. Dabei wurden u.a. auch die paarweisen Interaktionen innerhalb des trimeren Komplexes *in vivo* und *in vitro* analysiert. Unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde eine Interaktion von Yae1 mit Lto1, sowie von Yae1 mit Rli1 bestätigt, jedoch konnte keine direkte binäre Interaktion von Lto1 und Rli1 gezeigt werden. Da in Ko-Immunpräzipitationsversuchen Rli1 sowohl mit Yae1, als auch mit Lto1 präzipitiert wurde, geht man davon aus, dass die Assoziation von Rli1 mit Lto1 über das endogene Yae1 vermittelt wird.

Um die genaue Zusammensetzung und die paarweisen Interaktionen im trimeren Komplex aus Yae1, Lto1 und Rli1, bzw. die binären Interaktionen von Yae1 und Lto1 mit den Komponenten des CIA-Targetingkomplexes besser zu verstehen, werden weitere Ko-Immunpräzipitationsversuche nötig sein. Denkbar wäre, dazu einen der Komplexpartner zu depletieren und die Proteinmenge bzw. die Interaktionen der übrigen Faktoren zu untersuchen.

Zusätzlich könnte die Aufklärung der Strukturen der zugrundeliegenden Komponenten helfen, die physiologische Relevanz dieser Interaktion auch mechanistisch weiter aufzuklären. Es ist denkbar, dass Yae1 und Lto1 ihren Komplexpartner Rli1 an den CIA-Targetingkomplex andocken und dort dann die eigentliche Fe-S Cluster-Insertion erfolgt. Eine direkte Rolle von Yae1 und Lto1 beim Transfer des Kofaktors ist relativ unwahrscheinlich, da beide Proteine keine Cystein motive besitzen, die für die Koordination eines Fe-S Clusters notwendig wären.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Yae1 und Lto1 die ersten CIA-Faktoren in der Hefe ausfindig gemacht werden, die spezifisch für die Reifung von nur einem Zielprotein benötigt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Faktoren eventuell auch als Reifungsfaktoren für bisher nicht untersuchte Zielproteine im Zytosol oder Kern fungieren. Sie unterscheiden sich damit grundlegend von der Funktion der anderen acht CIA-Faktoren, deren Notwendigkeit bei der Reifung aller extra-mitochondrialen Zielproteine in früheren Arbeiten bestätigt wurde. Da aus Studien der humanen CIA-Faktoren jedoch eine vergleichbare Substratspezifität berichtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass es auch in der Hefe Faktoren gibt, die spezifisch die Maturierung eines einzigen Zielproteins veranlassen.

Überdies konnte eine solche Substratspezifität von Reifungsfaktoren durch frühere Arbeiten an der mitochondrial lokalisierten ISC-Maschinerie demonstriert werden. Während die zentrale ISC-Maschinerie für die Maturierung aller mitochondrialen Fe-S Proteine benötigt wird, erfordert die Reifung von [4Fe-4S]-Proteinen, im Gegensatz

zur Reifung der [2Fe-2S]-Proteine, zusätzliche Faktoren, wie Isa1/2 und Iba57 (Gelling *et al.*, 2008; Muhlenhoff *et al.*, 2011).

Auch die Reifung von Proteinen mit mehr als einem Fe-S Cluster erfordert zusätzliche Faktoren. So konnte gezeigt werden, dass die Maturierung des Komplexes I der Atmungskette, der acht Fe-S Cluster koordiniert, neben der ISC-Maschinerie von Isa1/2, Nfu1, Aim1 und der P-loop NTPase Ind1 abhängt (Bych *et al.*, 2008; Cameron *et al.*, 2011; Muhlenhoff *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011; Sheftel *et al.*, 2009).

3.6 Yae1 und Lto1 sind spezifische Reifungsfaktoren, aber keine Stabilisatoren der Fe-S Cluster von Rli1

Nachdem in meiner Arbeit eine Rolle der beiden Proteine Yae1 und Lto1 bei der Reifung des Fe-S Proteins Rli1 demonstriert werden konnte, stellte sich die Frage nach der genauen Funktion der beiden Faktoren. Es ist zum einen denkbar, dass extra-mitochondriale Proteine, die mehr als einen Fe-S Cluster koordinieren, auch mehrere Reifungsfaktoren erfordern. Dies wäre analog zu der Biogenese mitochondrialer Proteine mit mehreren Fe-S Kofaktoren, z.B. der Komplex I der Atmungskette in der Hefe. Auch hier erfordert die Maturierung neben der zentralen ISC-Maschinerie weitere Reifungsfaktoren (Bych *et al.*, 2008; Cameron *et al.*, 2011; Muhlenhoff *et al.*, 2011; Navarro-Sastre *et al.*, 2011). Vergleichbar damit könnte man sich aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten vorstellen, dass die bereits charakterisierten CIA-Komponenten Dre2, Tah18, Cfd1, Nbp35, Nar1, Cia1, Cia2 und Met18 die Kern-Maschinerie ausmachen, die für die Reifung der Zielproteine mit nur einem [4Fe-4S]-Cluster erforderlich ist, wohingegen Proteine wie Rli1, die mehr als einen Cluster koordinieren, weitere Reifungsfaktoren benötigen. Dies würde sich mit der Beobachtung decken, dass in der vorliegenden Arbeit kein weiteres Zielprotein ausfindig gemacht werden konnte, dessen Reifung von den beiden Faktoren Yae1 und Lto1 abhängt. Alle Reporter-Zielproteine, die in dieser Arbeit verwendet wurden, darunter Rad3, Ntg2, Pol3 und Ecm17, koordinieren nur einen [4Fe-4S]-Cluster (Netz *et al.*, 2013). Davon ausgenommen sind die CIA-Faktoren Nbp35 und Nar1, die zwar mehr als einen Fe-S Cluster koordinieren, deren Reifung jedoch nachweislich nicht von Yae1 und Lto1 abhängig ist. Die weitere Aufklärung der Spezifität von Yae1 und Lto1 erfordert daher, deren Notwendigkeit bei der Reifung weiterer Fe-S Zielproteine mit mehr als einem Fe-S Kofaktor zu untersuchen. Beispiele für weitere extra-mitochondriale Proteine mit zwei [4Fe-4S]-Clustern sind das Elongator Protein Elp3 (tRNA *Wobble*-Basen Modifikation) und Tyw1, ein Protein, das für die Synthese Wybutosin-modifizierter tRNA benötigt wird (Noma & Suzuki, 2006; Wittschieben *et al.*, 1999). Die Aufklärung einer Funktion der beiden Faktoren Yae1 und Lto1 bei der Reifung solcher Fe-S Proteine wird

daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, um die Spezifität der zwei neuen CIA-Faktoren weiter zu charakterisieren.

Durch weitere Experimente konnte im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden, dass es sich bei Yae1 (und vermutlich Lto1) um Stabilisatoren der empfindlichen Fe-S Cluster von Rli1 handelt. Rli1 ist ein essentielles Protein, das für seine Funktion bei der Translation von Proteinen auf die Koordination von Fe-S Kofaktoren angewiesen ist. Es wurde als die Achilles' Verse vieler aerober Organismen charakterisiert, da seine Fe-S Cluster besonders empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind (Alhebshi *et al.*, 2012). Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob Yae1 und Lto1 vielleicht eine Funktion als Stabilisatoren der Fe-S Cluster von Rli1 zukommt, um diese nach dem Einbau vor oxidativem Stress zu schützen. Eine solche stabilisierende Funktion wäre mit der Beobachtung vereinbar, dass beide Faktoren unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell sind (Snoek & Steensma, 2006). Dies könnte auch erklären, warum beide Faktoren nicht in Archaea gefunden werden, obwohl ihr Komplexpartner, das Fe-S Protein Rli1, mit einer Sequenzidentität von 45-50 % eines der am höchsten konservierten Proteine in Archaea und Eukaryoten ist (Barthelme *et al.*, 2007; Karcher *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein experimentelles System entwickelt, das erstmals die Unterscheidung einer Funktion als Stabilisator von einer Funktion als Reifungsfaktor erlaubt. Dabei wurden Yae1 und Lto1 mit einer photosensitiven Domäne (psd) fusioniert, die durch Blaulicht aktiviert wird und damit den gezielten Abbau der Fusionsproteine unter physiologischen Bedingungen einleitet (**Abb. 2.24**) (Renicke *et al.*, 2013). Die Methode wurde für meine Fragestellung adaptiert und eingesetzt, um die Stabilität der Rli1-assoziierten Fe-S Cluster in An- und Abwesenheit von Yae1 und Lto1 zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Fe-S Cluster von Rli1 stabil mit dem Protein assoziiert bleiben, selbst wenn Yae1 abgebaut wird (**Abb. 2.28**). Dies macht eine Funktion als Stabilisator unwahrscheinlich. Man geht von einer ähnlichen Eigenschaft für den zweiten Faktor Lto1 aus. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht experimentell belegt werden, da die Funktion von Lto1 durch Fusion mit der psd-Domäne beeinträchtigt war.

In der vorliegenden Arbeit wurden Yae1 und Lto1 durch unterschiedliche experimentelle Ansätze als spezifische Reifungsfaktoren für das Fe-S Protein Rli1 charakterisiert. Dieser Befund ist schwer zu vereinbaren mit den Daten einer früheren Studie, die den Proteinen Yae1 und Lto1 unter anaeroben Bedingungen eine nicht essentielle Funktion zuordnen (Snoek & Steensma, 2006). Es ist bekannt, dass Rli1 für seine Funktion auf

die Fe-S Cluster unter aeroben und anaeroben Bedingungen angewiesen ist. Man würde daher erwarten, dass auch die hier charakterisierten Reifungsfaktoren unter beiden Bedingungen essentiell sein müssten. Die Funktion von Yae1 und Lto1 in Bezug auf die Fe-S Proteinbiogenese unter anaeroben Bedingungen wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht (**Abb. 2.29**). Durch den Einbau von ^{55}Fe in das Fe-S Protein Rli1 konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass Yae1 und Lto1 sich auch unter anaeroben Bedingungen wie Reifungsfaktoren verhalten.

Eine mögliche Begründung für die Beobachtung der früheren Studie, dass Yae1 und Lto1 anaerob nicht benötigt werden, könnte sein, dass die Funktion beider Faktoren unter anaeroben Bedingungen zu einem bestimmten Grad umgangen werden kann, sodass eine basale, zum Überleben der Zelle ausreichende Menge von Holo-Rli1 auch in deren Abwesenheit gebildet werden kann.

Zusätzlich ist wahrscheinlich, dass Rli1 unter anaeroben Bedingungen stabiler ist, was die Neubildung des Holoproteins weniger notwendig macht. Mithilfe eines Wachstumsexperimentes konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine plasmidkodierte Rli1-Version mit einer Mutation in einem der Cluster-koordinierenden Motive (C25S oder C61S) fähig ist, den Wachstumsdefekt Rli1-depletierter Zellen unter anaeroben Bedingungen zu komplementieren (**Abb. 2.30**). Vergleichbar damit konnte in einer anderen Arbeit bestätigt werden, dass der Wachstumsdefekt einer *rli1Δ*-Zelle unter anaeroben Bedingungen partiell durch die Expression der Rli1_{C25S}-Mutante komplementiert werden kann (Zhai *et al.*, 2013). Lediglich die gleichzeitige Mutation beider Fe-S Cluster-koordinierenden Motive (C25S; C61S) ist, wie hier gezeigt, für die Zelle unter anaeroben Bedingungen letal. Im Gegensatz dazu kann keine der verwendeten Einzel- oder Doppelmутanten den Wachstumsdefekt unter aeroben Bedingungen komplementieren (**Abb. 2.30**).

Dieses Ergebnis beinhaltet, dass ein labiler Fe-S Cluster unter anaeroben Bedingungen scheinbar ausreicht, um das Wachstum der Zelle zu gewährleisten und folglich, dass Rli1 unter anaeroben Bedingungen stabiler ist. Diese Stabilität verbunden mit einer möglichen schwach ablaufenden Biogenese in Abwesenheit von Yae1 und Lto1 könnte erklären, warum beide Reifungsfaktoren unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell sind.

3.7 Funktionen von Lto1 außerhalb der Fe-S Proteinbiogenese

Während der Anfertigung meiner Arbeit konnte in einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Lto1 eine vermeintliche Rolle bei der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit spielt, wobei die Biogenese der kleinen Untereinheit nicht betroffen ist (Zhai *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde eine Rolle von Lto1 beim Schutz der 60S Untereinheit vor

reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) angenommen, da gezeigt werden konnte, dass die Reifung der 60S Untereinheit in *lto1Δ* Mutanten, die von anaeroben auf aerobe Bedingungen umgesetzt wurden, drastisch reduziert ist, wohingegen der Export der 40S Untereinheit nicht betroffen ist. Überdies wurde in der damaligen Arbeit eine erhöhte Empfindlichkeit der Lto1-Mutanten gegenüber Hydroperoxiden gezeigt.

Zeitgleich wurde das Fe-S Protein Rli1 als Zielprotein für ROS-vermittelte Schädigung der Zelle beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von ROS die Insertion der Fe-S Cluster in Rli1 betrifft und nicht die Folge einer Oxidation der bereits integrierten Cluster ist (Alhebshi *et al.*, 2012). Dies führte zu der Annahme, dass die Interaktion von Lto1 mit Rli1 zwei Funktionen hat, nämlich die Biogenese und der Schutz der großen ribosomalen Untereinheit vor oxidativem Stress (Zhai *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu dieser vermeintlichen Funktion von Lto1, konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch unterschiedliche experimentelle Ansätze gezeigt werden, dass Lto1, wie auch Yae1, hoch spezifische Faktoren für die Reifung des Fe-S Proteins Rli1 sind und eine Rolle als Stabilisationsfaktoren der Fe-S Cluster unwahrscheinlich ist.

Die Depletion des Fe-S Proteins Rli1 führt, wie bereits bekannt, zu einer nukleären Akkumulation der 40S und 60S Untereinheit des Ribosoms, da die Prozessierung von pre-rRNAs, die mit beiden Untereinheiten assoziiert sind, beeinträchtigt ist (Kispal *et al.*, 2005; Yarunin *et al.*, 2005). Da Rli1 bekanntlich für die Maturierung und den Export beider ribosomaler Untereinheiten essentiell ist, hätte man erwartet, dass eine Beeinträchtigung der Funktion des von uns als Rli1-spezifischen Reifungsfaktors charakterisierten Lto1 auch die Akkumulation beider Untereinheiten zur Folge hat. Dies konnte von Zhai *et al.* allerdings nicht gezeigt werden. Der Grund hierfür bleibt unklar.

Unter Verwendung der in meiner Arbeit generierten Gal-Mutanten wird die Funktion von Yae1 und Lto1 beim Export der beiden ribosomalen Untereinheiten zukünftig umfassend geklärt werden müssen. Die Fusion von Reporterproteinen der kleinen und großen Untereinheiten mit GFP kann dabei Aufschluss darüber geben, ob die Maturierung und der Export durch Depletion von Yae1 und Lto1 beeinträchtigt ist (Kispal *et al.*, 2005; Milkereit *et al.*, 2003; Yarunin *et al.*, 2005). Trifft dies nach der jeweiligen Depletion auf beide ribosomale Untereinheiten zu, hat man einen weiteren Hinweis, dass sowohl Yae1 als auch Lto1 indirekt für die Maturierung des Ribosoms essentiell sind, indem sie die Reifung des essentiellen Faktors Rli1 veranlassen. Damit würde die 60S-spezifische Funktion von Lto1, die von Zhai *et al.* postuliert wurde, widerlegt. Unabhängig von diesen Überlegungen ist die Rolle von Yae1 und Lto1 als neue spezifische CIA-Reifungsfaktoren für das Fe-S Protein Rli1 zweifelsfrei geklärt.

4 Ausblick

Zusammenfassend lieferte diese Arbeit einerseits einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkungen der einzelnen CIA-Komponenten untereinander. Andererseits wurden mit Yae1 und Lto1 zwei neue CIA-Faktoren entdeckt, die von der Hefe bis zum Menschen konserviert sind. Diesen beiden neuen CIA-Proteinen wurde eine spezifische Funktion bei der Reifung des essentiellen Fe-S Proteins Rli1 in der Hefe zugeordnet. Ob die humanen Homologen YAE1D1 und ORAOV1 auch eine Funktion bei der Reifung des humanen Rli1 Homologs ABCE1 haben, müssen zukünftige Studien im humanen System klären. Es konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass der humane Komplex den Wachstumsdefekt und den Reifungsdefekt von Rli1 in Yae1- oder Lto1-depletierten Hefezellen komplementieren kann (**Abb. 2.31** und **Abb. 2.32**). Zusätzlich konnte durch eine frühere systematische Analyse im humanen System die Interaktion von ORAOV1 mit dem CIA-Targetingkomplex (MMS19), der gleichzeitig die Interaktion mit dem Zielprotein ABCE1 vermittelt, detektiert werden (Stehling *et al.*, 2012). Obwohl bisher noch keine direkte Interaktion von ORAOV1 bzw. YAE1D1 und ABCE1 annotiert ist, gibt die Interaktion von ORAOV1 mit dem späten CIA-Faktor MMS19 einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Funktion des YAE1D1-ORAOV1 Komplexes bei der Maturierung von ABCE1 von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist.

Weitere Untersuchungen müssen die genaue Aufgabe von Yae1 und Lto1 beim Fe-S Cluster-Einbau in Rli1 klären. Von besonderer Bedeutung wird dabei die Funktion der noch wenig untersuchten deka-GX₃-Domäne in den beiden Proteinen sein. Womöglich erlaubt dieser Teil die Heterodimerisierung von Yae1 und Lto1. Die Aufklärung der Struktur beider Proteine könnte einen Hinweis auf den zugrunde liegenden Mechanismus der Substratspezifität beim Einbau des Fe-S Clusters in Rli1 geben.

Zusätzlich wird die Funktion der Fe-S Cluster von Rli1 aufgeklärt werden müssen. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Kofaktoren lediglich um strukturgebende Elemente handelt, oder ob sie katalytisch aktiv sind. Im besonderen Fokus wird dabei die unterschiedliche Anforderung der Zelle unter aeroben oder anaeroben Wachstumsbedingungen stehen. Es ist bisher nicht umfassend geklärt, warum die beiden Reifungsfaktoren Yae1 und Lto1 unter anaeroben Bedingungen nicht essentiell für das Wachstum der Zelle sind. Es wird angenommen, dass unter anaeroben Bedingungen die Funktion beider Proteine zu einem gewissen Grad umgangen werden und auch in deren Abwesenheit eine zum Überleben der Zelle ausreichende Menge an Holo-Rli1 gebildet werden kann. Dies lässt sich vereinbaren mit der erhöhten Stabilität

des Fe-S Proteins Rli1 unter anaeroben Bedingungen, was eine geringere Neubildung des Holo Proteins notwendig macht. Ähnliches wurde für den spät agierenden Faktor der mitochondrialen ISC-Maschinerie Grx5 berichtet. Dieser Faktor ist an der Reifung aller mitochondrialen Fe-S Proteine unter aeroben Bedingungen beteiligt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass u.a. die Maturierung der Aconitase nach Deletion von Grx5 unter anaeroben Bedingungen noch zu einem hohen Grad aufrechterhalten werden kann (persönliche Mitteilung Dr. Marta Uzarska). Die beobachtete Stabilität von Rli1 ist vergleichbar mit der Stabilität der Aconitase unter anaeroben Bedingungen.

Um die Funktion von Yae1 und Lto1 bei der Fe-S Proteinbiogenese unter anaeroben Bedingungen abschließend zu klären, müssen Deletionsmutanten generiert werden. Die Reifung von Rli1 unter anaeroben Bedingungen muss dann nach Deletion von Yae1 oder Lto1 im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden.

Unter Verwendung weiterer Fe-S Reporterproteine wie Elp3 und Tyw1 sollte die Substratspezifität von Yae1 und Lto1 weiter charakterisiert werden. Es sollte dabei geklärt werden, ob diese beiden Faktoren generell für die Reifung von Fe-S Proteinen benötigt werden, die mehr als einen [4Fe-4S]-Cluster koordinieren.

Schließlich eröffnet diese Arbeit die interessante Frage, ob noch zusätzliche, spezifische CIA-Faktoren in der Hefe existieren, die für die Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine benötigt werden. Zukünftige Interaktionsanalysen müssen folglich dahingehend optimiert werden, dass die transienten Interaktionen zwischen CIA-Faktoren und Fe-S Zielproteinen detektierbar sind.

Ein weiteres Ziel wird die Klärung der Frage sein, nach welchem molekularen Mechanismus solch hoch spezifische Faktoren den Fe-S Cluster-Einbau in Zielproteine gewährleisten.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Gerät	Modell, Hersteller
Agarose-Gelkammern	B1A, Owl Separation Systems
Anaerobenkammer	COY, Laboratory Products Inc.
Autoklaven	Systec V-150, Systec GmbH Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V.
Blaulichtbox (LED-Lampe, 465 nm, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Eigenbau Dr. Christof Taxis, Marburg
Blotapparatur	Semidry-Blotter Sedec M, Peqlab Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad
Dokumentationssysteme:	
Agarosegelelektrophorese	Gel iX Imager, Intas
Chemilumineszenz-Messungen	Chemostar Professional, Intas
Fluoreszenzspektrophotometer	FP-6300, Jasco
Inkubatoren	Function line, Heraeus instruments Steri Cult, Forma Scientific Mini-Brutschrank, neoLab
Netzgerät	EPS600, Pharmacia Biotech
pH-Meter	Lab 850, Schott Instruments
Planetenmühle PULVERISETTE 5	FRITSCH
Plattenlesegerät	Infinite R M200, Tecan
Spektrophotometer	Genesys 20, Thermo Scientific
Pipettierhilfen	Pipetman, Gilson
Reinstwasseranlage	Elix 5, Millipore
Schüttelinkubatoren	Multitron, HT INFORS
SDS-PAGE System	Minigel-Twin, Biometra Mini-PROTEAN ©, Bio-Rad
Sterilbank	Labgard Class II, IBS Integra Biosciences
Sterilisator	Modell 700, Memmert
Szintillationszähler	LS 6500 Scintillation Counter, Beckmann
Thermocycler	Advanced primus 25, Peqlab
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Ultracentrifuge XL-100K
UV/VIS-Spektralphotometer	U-550, Jasco
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Waagen	PT 1500, Sartorius SBC22, Scaltec PCB, Kern
Wippschüttler	ST5, Ingenieurbüro CAT
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus 3K30, Sigma Megafuge 1.OR, Heraeus Avanti J20 XP, Beckmann

5.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a.).

Chemikalie	Hersteller
⁵⁵ Fe-Eisenchlorid, 10 mCi / ml, 30 mCi / mg	Perkin Elmer
Aceton	Roth
Aceton HPLC Grade	Roth
Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Adeninsulfat	AppliChem
Agar	Roth
Aminosäuren	Merck, Sigma
Ammoniumbismutcitrat	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma Aldrich
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
Bacto Pepton, Bacto Trypton	DIFCO
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Merck
Casein Pepton	MP Biomedical
ClonNAT (Nurseothricin)	WernerBioagents
Cycloheximid	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMSO	AppliChem
Doxycyclin	Sigma Aldrich
EDTA	Acros Organics
EGTA	Acros Organics
Ergosterol	Sigma Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Formaldehyd	Acros Organics
Galactose	AppliChem
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Geneticindisulfat (G418)	Roth
Glucose Monohydrat	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hepes	Roth
3-Isopropylmalat	Wako
Iodacetamid	BioRad
Kaliumacetat	Sigma Aldrich
LE Agarose	Biozym
Magnesiumchlorid	Fluka
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Na-Citrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	AppliChem
Natriumsulfit	Sigma Aldrich
Natriumthiosulfat	Merck
NP-40 (Igepal)	Sigma Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
Polyethylenglycol (PEG) 4000	Roth

Chemikalie	Hersteller
Salzsäure	Roth
Silbernitrat	AppliChem
Szintillations-Cocktail Ultima Gold	Perkin Elmer
TEMED	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Roth
Triton-X100	Sigma Aldrich
Trypton	AppliChem
Tween 20	Sigma Aldrich
Tween 80	Sigma Aldrich
Yeast Nitrogen Base	Formedium
Yeast Nitrogen Base (-Fe)	Formedium

5.1.3 Verbrauchsmaterialien + Proteaseinhibitoren

Verbrauchsmaterial / Inhibitor	Hersteller
AEBSF (Pefabloc)	Fluka
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Sigma
Calmodulin-Sepharose	GE Healthcare
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Peqlab
Eppis silikonisiert und graduiert	Biozym
Glasperlen (0,75 - 1 mm)	Roth
HA-Sepharose	Santa Cruz
IgG-Sepharose	GE Healthcare
Lachssperma-DNA	Invitrogen
Leupeptin Hemisulfat	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Säulchen f. TAP	MobiTec Göttingen
Mobicols M1002	
Filter 90 µm M2190	
Bottom plugs M3005	
Zirkonia / Silica beads (0,5 mm)	Biospec Products

5.1.4 Komplettsysteme

Komplettsystem	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence System (ECL)	GE Healthcare
Luciferase Assay System	Promega
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel

5.1.5 Enzyme

5.1.5.1 Restriktionsenzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen *Fermentas* und *NEB (New England Biolabs)* bezogen. Die Verwendung entsprach dabei der Empfehlung des Herstellers.

5.1.5.2 Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes
RNase A	Roth
T4 DNA-Ligase	Fermentas
TEV Protease	eigene Herstellung des Labors (Dr. Mühlenhoff)
Zymolyase® 100T	nacalai tesque

5.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
αHA	Santa Cruz
αMyc	Santa Cruz
αTAP	Thermo Scientific

Weitere Antiseren wurden aus Kaninchen durch Immunisierung mit rekombinantem Protein gewonnen. Für die Herstellung des Lto1-Antikörpers wurde ein KLH-Konjugat (MDFDNLNLEEQYC) zur Immunisierung verwendet (*GenScript*). Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurden von der Firma *BioRad* bezogen.

5.1.7 Größenstandards für DNA und Proteine

Größenstandard	Hersteller
<i>GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder</i>	Fermentas
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas

5.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* bezogen. Oligonukleotide mit einer Länge <33 nt wurden entsalzt, wohingegen längere per HPLC gereinigt und lyophilisiert wurden.

5.2.1 Oligonukleotide zur endogenen Modifikation von *S. cerevisiae*

Im Folgenden sind die für die endogene Modifikation verwendeten Oligonukleotidpaare und die Oligonukleotide zur Sicherstellung der Richtigkeit via PCR aufgeführt.

Gen	Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
CFD1	Cfd1_S2	CACACACACACATATATATATATACGTACATGCATAGGAGAGGATCTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
	Cfd1_S3	CAACCCCTGTTGTGGATAAACACGAGCAACCCAGATAGAATCTCCAAAA CGTACGCTGCAGGTTCGAC
	Cfd1_499for	CCACAGAGTGTTGCAACAGC
	Cfd1_Yil002rev	CCCAATCCATTCGTTGAGAACG
	NatCterm2010	CCTAATCTCGAGGCGAATTTC
CIA1	Cia1_S2	GATCACTGTGTTAATATGAGTTCCTGAATTGTACTCTTGCTTCTACATCTA ATCGATGAATTCGAGCTCG
	Cia1_S3	CAGGCGGTGACGACGGGATCGTAAATTCTGGTCTCTAGAAAAAGCAGC GCGTACGCTGCAGGTTCGAC
	Cia1_638for	GACTGTGCAGTGGAAGCGAC
	Cia1_ydr266rev	GAGGTTGGGTTTCAGCAGAAAGG

Gen	Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
CIA2	Cia2_S2	GTTTTTTGATAGCTTCGTGAGTAAGGGAAGCAAAAAGAAGAATCCCCGTT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
	Cia2_S3	GAGAATGAACAACTGTTGGGTAGTCTCTAAGATGTTAGTGACTTGTA GCGTACGCTGCAGGTCGAC
	Cia2_354for	CCCTGAGCACCCGTTAAGTC
	Cia2_Ept1rev	CTTCGATACCAGCGAGCGG
DRE2	Dre2_S2	CACCAAAGTAGACCAATTGACGTCAATTTACTGAAACGAATGTGCAGGGTT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
	Dre2_S3	CTTTCAAGCCTGGTCAACCTATCAATTTGGACAGCATTTTCAGATGACTTGC GTACGCTGCAGGTCGAC
	Dre2_670for	GTGGATACCAGCGATGATTCC
	Dre2_Ykr070rev	TCGAGTTAAATGGTGAACCCCTTGC
LTO1 (YNL260C)	Ynl260c_S1	GTAGCCATTTGCCTTTTCAGTATAATCTTACTAATATAAAAAATCTCAATCAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
	Ynl260c_S4	GATTTAAACAAGTTTTTTTTTCATTTTTCTTATAAAACGATTTCTCACCATCG ATGAATTCCTCTGTCG
	Atx1_for	GTCGTCATGACCTGCTCGGGATG
	Ynl260c_-521	CTCCGGCAATGGCCCTTGAAACG
LTO1_{Start+108}	Ynl260c_SV_S1	CTTATCATATTTGAAGAGTAAATGGAAAGTAAAGATCACTGGACAAATAAA AATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	Ynl260c_S4_SV	AAACCTTCTTGGTAATACTGTTCTTCTAGGTTTAGTAAATTATCAAAATCCA TCGATGAATTCCTCTGTCG
	Ynl260c_S2	GTTTAGTTGCTCTTTTTGGCGGCCGCGATAATGTTCTTCACTTGGTATTC TTAATCGATGAATTCGAGCTCG
	Ynl260C_S3	ATGAAGACATCGCAAAGAATAAGACAAAACAAAATCAGGCTCAATCCTGG CGTACGCTGCAGGTCGAC
MET18	LTO1_513_FOR	CATTGCCGGAGAAAATTAGAGG
	LTO1_C_REV	GTATGTATCTCGCATTACTAAGG
	Met18_S2	GATTTTCACGTGCTCATCAATGTGAACAAATTATTAAATACAAGCGTTTAAT CGATGAATTCGAGCTCG
	Met18_S3	GCGTTGACACAAGACAGGTTTATTATGAATTAGGCCAAATCCCGTTTCGAG CGTACGCTGCAGGTCGAC
NAR1	Met18_2748for	GCAGGCTTTGGATATGCCTG
	Met18_Yil127rev	CTAAATACCAGGCCACCTCGG
	Nar1_S2	GTTTGTGGTGATTTACGCTTATGTACACGGGTGCAAACTACACCTTACT TAATCGATGAATTCGAGCTCG
	Nar1_S3	CCGTCAAGCAGGCCGTCGAAAAGGATCTCGTCTCTGTTGGGAGCACCTG GCGTACGCTGCAGGTCGAC
NBP35	Nar1_1129for	CTGCGGAAGAGACGAACAGG
	Nar1_Zwf1rev	CTTGGTAGATGGATCAAGGTAACC
	Nbp35_S2	CGATTGACCTCTAATGCACCTTCTTTTATTCTTTTTGATAAAATATACTAA TCGATGAATTCGAGCTCG
	Nbp35_S3	GTGCTGTACTTAACGTTGTGGAGGCTCTGCGAGATGCTGTGGGGGATGT ACGTACGCTGCAGGTCGAC
TAH18	Nbp35_648for	CACCACACCTCAGGAAGTAGC
	Nbp35_Nup145rev	GTACAAAATCTACTCCTGGGTTTCG
	Tah18_S2	GATTTTAATTATGTATCTATTTAACATTATAATGCGATAAGTCTTGTTATCG ACTAATCGATGAATTCGAGCTCG
	Tah18_S3	CCAAAAATACCTGAAAGAAATGAAAAATCTGATAGATATATCCAGGAAA CTTGCGTACGCTGCAGGTCGAC
YAE1	Tah18_1458for	CGGTCTAGCACCATTTATTCAGTGG
	Tah18_Atq11rev	GAGAACGCTATTGGAGAGATTCC
	Yae1_S1	TTGATAGAAGAGAACAAAAAGGAACAGTGTTACAATAGTATATAGAGATG CGTACGCTGCAGGTCGAC
	Yae1_S4	TTCAGTTTCGACATCACTGTCTGATGCCCATACATCGTCCCAAGTATTCGA CATCGATGAATTCCTGTCTG
YAE1	Rfc2_for	CTCCAAGTCATGTTTGCTAGGC
	Yae1_-421	GGATAGATGGCACATGGTAC
	Yae1_S2	TGATATAAGGTACATAAATTGTGAAATCAACTCCATTTAAACAACTTTAAT CGATGAATTCGAGCTCG
	Yae1_S3	ACTGATATTGCCAATACCTATTGTGAAAAGTACCATGTGCCATCTATCCAA CGTACGCTGCAGGTCGAC
YAE1	Yae1_274_for	GATGCTCAAAAAGAATTACGC
	YAE1 C_rev	TCTGGGACTAGGTGATCGCC

5.2.2 Oligonukleotide zur Konstruktion von Genexpressionsvektoren in *S. cerevisiae*

Gen	Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
LTO1 (YNL260C)	Ynl260c_BamHI	ATGGTAGGATCCCCAGGATTGAGCCTGATTTTG
	Ynl260c_SV_BamHI	GTAGGATCCAATGGATTTTGATAATTTACTAAAC
	Ynl260c_HindIII	AGGTAAAGCTTACCAGGATTGAGCCTGATTTTG
	Ynl260c_SpeI	GGTAACTAGTATGGTGAGAAATCGTTTTATAAG
	Ynl260c_NP_SacI	GGTAGAGCTCATTGCAGGATGAGATTTCCAACG
	Ynl260c_M01_for	AATCTCAATCTAGGTGAGAAATCGTTTTATAAG
	Ynl260c_M01_rev	GATTTCTCACCTAGATTGAGATTTTATATTAG
	Ynl260c_M10_for	GAAAATAGAAAAAACTTGTTTAAATCAAATC
	Ynl260c_M10_rev	AAACAAGTTTTTTTCTATTTTCTTATAAAACG
	Ynl260c_NP_-1REV	GTACCATGGTTTTATTTGTCCAGTGATCTTTAC
	Ynl260c_NP_-46REV	GTACCATGGTGATAAGTGATTTGATTTAAACAAG
	Ynl260c_NP_-109REV	GGTACCATGGATTGAGATTTTATATTAGTAAG
	Ynl260c_NP_-198REV	GGTACCATGGACTTTTTTCTTCGTAAGCATCC
ORAOV1	ORAOV_SpeI	GGTAACTAGTATGGCTGGCAGTCAGGACATA
	ORAOV_HindIII	CCATAAGCTTTCAAATGAAAGTCCGGAACC
YAE1	Yae1_BamHI	TGGTAGGATCCTTGGATAGATGGCACATGGTAC
	Yae1_HindIII	GGTAAAGCTTATTGGATAGATGGCACATGGTAC
	Yae1_SpeI	TGGTAACTAGTATGTCTGAATACTTGGGACGATG
	Yae1_NP_SacI	GGTAGAGCTCTTACAATAGAGATACCACGTTTCG
Basisvektor Matrix	S3_rev	ACCGGAGTCGACCTGCAGCGTACG
	Apal_S3_Int	ATGGTAGGGCCCTCCGGTTCTGCTGCTAG
	CBP_TEV_Apal	ATGGTAGGGCCCGGCTTCATCGTGTTCGCAAG
	Sall_CBP_TEV	ATGGTAGTCGACGGAAGCATGGAAAAGAGAAGATGG
	pYM_seq4	GGACATATTGTCGTTAGAACG

5.3 Plasmide

Durch DNA-Sequenzierung (Firma *Seqlab*) wurden alle Plasmide überprüft und somit die Richtigkeit der einklonierten Sequenzen sichergestellt.

5.3.1 Ausgangsplasmide

Plasmid	Eigenschaften	Gen	Promotor	Tag	Marker	Referenz
p416-MET25	ARS/CEN, <i>Amp^R</i>	-	<i>MET25</i>	-	<i>URA3</i>	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)
p424-TDH3	2μ, <i>Amp^R</i>	-	<i>TDH3</i>	-	<i>TRP1</i>	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)
p426-TDH3	2μ, <i>Amp^R</i>	-	<i>TDH3</i>	-	<i>URA3</i>	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)
pYM15	<i>Amp^R</i>			6HA, C-terminal	<i>HIS3MX6</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM21	<i>Amp^R</i>	-		9Myc, C-terminal	<i>natNT2</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pYM-N27	<i>Amp^R</i>	-	<i>GALL</i>		<i>natNT2</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pBS1539	<i>Amp^R</i>	-		TAP, C-terminal	<i>URA3</i>	(Puig <i>et al.</i> , 2001)
pYM21-CBP-TEV-9Myc	<i>Amp^R</i>	-		CBP-TEV-9Myc, C-terminal	<i>natNT2</i>	diese Arbeit
p414-MET25-LUX	ARS/CEN, <i>Amp^R</i>	<i>luc2</i> (<i>Photinus pyralis</i>)	<i>MET25</i>		<i>TRP1</i>	U. Mühlenhoff
pDS121_9	<i>Amp^R</i>	-		3Myc- AtLOV2 _{E598N} - cODC1 (photosensitives Degron)	<i>kanMX4</i>	C. Taxis, Marburg

Die Sequenz des humanen Gens *YAE1D1* wurde für Klonierungszwecke von der Firma *eurofins* synthetisiert (pEX-A-YAE1D1, Amp^R). Das humane Gen *ORAOV1* wurde von *SourceBioscience* bezogen (pOTB7-ORAOV1, Cam^R, IMAGE ID 4544931/AU101 H10 M13F).

5.3.2 Plasmide zur Expression in *S. cerevisiae*

Plasmid	Gen	Tag	Promotor	Marker	Referenz
p416-NAR1-3HA	<i>NAR1</i>	3HA, C-terminal	<i>MET25</i>	<i>URA3</i>	(Hausmann <i>et al.</i> , 2005)
p416-3HA-NBP35	<i>NBP35</i>	3HA, N-terminal	<i>MET25</i>	<i>URA3</i>	(Netz <i>et al.</i> , 2012a)
p426-TDH3-NTG2-3HA	<i>NTG2</i>	3HA, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	(Balk <i>et al.</i> , 2004)
p416-MET25-3HA-POL3-CTD	<i>POL3-CTD</i>	3HA, N-terminal	<i>MET25</i>	<i>URA3</i>	(Netz <i>et al.</i> , 2012b)
p424-POL31	<i>POL31</i>	-	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	(Netz <i>et al.</i> , 2012b)
p424-TDH3-RAD3-3HA	<i>RAD3</i>	3HA, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p424-NP _{RLI1} -RLI1-3HA	<i>RLI1</i>	3HA, C-terminal	<i>pRLI1</i>	<i>TRP1</i>	(Kispal <i>et al.</i> , 2005)
p426-NP _{RLI1} -RLI1 _{C25S} -3HA	<i>RLI1</i> _{C25S}	3HA, C-terminal	<i>pRLI1</i>	<i>URA3</i>	(Kispal <i>et al.</i> , 2005)
p426-NP _{RLI1} -RLI1 _{C61S} -3HA	<i>RLI1</i> _{C61S}	3HA, C-terminal	<i>pRLI1</i>	<i>URA3</i>	(Kispal <i>et al.</i> , 2005)
p426-NP _{RLI1} -RLI1 _{C25;61S} -3HA	<i>RLI1</i> _{C25;61S}	3HA, C-terminal	<i>pRLI1</i>	<i>URA3</i>	(Kispal <i>et al.</i> , 2005)
p414-NP _{YAE1} -YAE1	<i>YAE1</i>	-	<i>pYAE1</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p416-NP _{YAE1} -YAE1	<i>YAE1</i>	-	<i>pYAE1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-NP _{YAE1} -YAE1	<i>YAE1</i>	-	<i>pYAE1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p424-TDH3-YAE1-Myc	<i>YAE1</i>	1Myc, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-YAE1-Myc	<i>YAE1</i>	1Myc, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-3HA-YAE1	<i>YAE1</i>	3HA, N-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1} -LTO1	<i>LTO1</i>	-	<i>pLTO1</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p416-NP _{LTO1} -LTO1	<i>LTO1</i>	-	<i>pLTO1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-NP _{LTO1} -LTO1	<i>LTO1</i>	-	<i>pLTO1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p424-TDH3-LTO1-Myc	<i>LTO1</i>	1Myc, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-LTO1-Myc	<i>LTO1</i>	1Myc, C-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-3HA-LTO1	<i>LTO1</i>	3HA, N-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-3HA-LTO1 _{Start+108}	<i>LTO1</i> _{Start+108}	3HA, N-terminal	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_M01mut} -LTO1	<i>LTO1</i> ; ATG1→STOP	-	<i>pLTO1</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_M01M10mut} -LTO1	<i>LTO1</i> ; ATG1/2→STOP	-	<i>pLTO1</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p416-NP _{LTO1_M01M10mut} -LTO1	<i>LTO1</i> ; ATG1/2→STOP	-	<i>pLTO1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_567-1} -LUX	<i>luc2</i>	-	<i>pLTO1</i> _{567 bis 1}	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_567-46} -LUX	<i>luc2</i>	-	<i>pLTO1</i> _{567 bis -46}	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_567-109} -LUX	<i>luc2</i>	-	<i>pLTO1</i> _{567 bis -109}	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p414-NP _{LTO1_567-198} -LUX	<i>luc2</i>	-	<i>pLTO1</i> _{567 bis -198}	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p416-MET25-YAE1D1	<i>YAE1D1</i>	-	<i>MET25</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p424-TDH3-YAE1D1	<i>YAE1D1</i>	-	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-YAE1D1	<i>YAE1D1</i>	-	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p416-MET25-ORAOV1	<i>ORAOV1</i>	-	<i>MET25</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p424-TDH3-ORAOV1	<i>ORAOV1</i>	-	<i>TDH3</i>	<i>TRP1</i>	diese Arbeit
p426-TDH3-ORAOV1	<i>ORAOV1</i>	-	<i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p416-MET25-LTO1-NP _{YAE1} -YAE1	<i>LTO1</i> <i>YAE1</i>	-	<i>MET25</i> <i>pYAE1</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit
p426-MET25-ORAOV1-TDH3-YAE1D1	<i>ORAOV1</i> <i>YAE1D1</i>	-	<i>MET25</i> <i>TDH3</i>	<i>URA3</i>	diese Arbeit

5.4 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Stamm DH5α von *Invitrogen* verwendet.

Genotyp: *F*- ϕ 80d*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZ*YA-*argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(*r_k⁻*, *m_k⁺*)
phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻

Er zeichnet sich aufgrund der Deletionen der EndonucleaseA und des DNA-Reparaturenzyms RecA durch eine hohe Replikationseffizienz und Plasmidreplikationsrate aus. Alle Klonierungen und Plasmidpräparationen wurden mit chemisch kompetenten Zellen dieses Stammes durchgeführt (s. 5.8.2).

5.5 Hefestämme

Die in dieser Arbeit erstmals verwendeten *S. cerevisiae* Stämme wurden mithilfe der „PCR toolbox“ konstruiert (Janke *et al.*, 2004). Dabei wurden unterschiedliche Genkassetten via PCR amplifiziert und mittels homologer Sequenzen innerhalb der Oligonukleotide direkt chromosomal integriert. Durch diese Methode kann man einen endogenen Promotor durch einen regulierbaren Promotor austauschen oder das Gen N- bzw. C-terminal mit einem Affinitäts-Tag fusionieren.

Hefestamm	Genotyp	Referenz
Wildtypstämme		
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 can1-100</i>	Euroscarf
SC0000	<i>MATa ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf
Regulierbare Stämme		
Gal-CFD1	W303-1A, <i>pCFD1::GAL1-10-HIS3</i>	(Netz <i>et al.</i> , 2007)
Gal-CIA1	W303-1A, <i>pCIA1::GAL1-10-HIS3</i>	(Balk <i>et al.</i> , 2005)
Gal-CIA2	W303-1A, <i>pCIA2::GAL1-10-HIS3</i>	J. Mascarenhas
Gal-DRE2	W303-1A, <i>pDRE2::GAL1-10-natNT2</i>	(Bernard <i>et al.</i> , 2013)
Gal-LTO1	W303-1A, <i>pLTO1::GALL-natNT2</i>	diese Arbeit
Gal-MET18	W303-1A, <i>pMET18::GALL-natNT2</i>	D. Netz
Gal-NAR1	W303-1A, <i>pNAR1::GAL1-10-HIS3</i>	(Balk <i>et al.</i> , 2004)
Gal-NBP35	W303-1A, <i>pNBP35::GAL1-10-HIS3</i>	(Hausmann <i>et al.</i> , 2005)
Gal-TAH18	W303-1A, <i>pTAH18::GAL1-10-HIS3</i>	(Bernard <i>et al.</i> , 2013)
Gal-YAE1	W303-1A, <i>pYAE1::GALL-natNT2</i>	diese Arbeit
Gal-YAH1	W303-1A, <i>pYAH1::GAL1-10-LEU2</i>	(Lange <i>et al.</i> , 2000)
Tet-RLI1	W303-1A, <i>pRLI1::TetO7-kanMX4</i>	(Kispal <i>et al.</i> , 2005)
TAP-Stämme		
CFD1-TAP (#SC2492)	SC0000, <i>CFD1-TAP::URA3</i>	Euroscarf
CIA1-TAP (#SC2420)	SC0000, <i>CIA1-TAP::URA3</i>	Euroscarf
CIA2-TAP (#SC1114)	SC0000, <i>CIA2-TAP::URA3</i>	Euroscarf
DRE2-TAP (#SC1243)	SC0000, <i>DRE2-TAP::URA3</i>	Euroscarf
LTO1-TAP (#SC4256)	SC0000, <i>LTO1-TAP::URA3</i>	Euroscarf
MET18-TAP (#SC2096)	SC0000, <i>MET18-TAP::URA3</i>	Euroscarf
NAR1-TAP (#SC1416)	SC0000, <i>NAR1-TAP::URA3</i>	Euroscarf
NBP35-TAP (#SC0234)	SC0000, <i>NBP35-TAP::URA3</i>	Euroscarf

Hefestamm	Genotyp	Referenz
PSD-Mutanten		
YAE1-psd	W303-1A, <i>YAE1-3Myc-AtLOV2_{E598N}-cODC1::kanMX4</i>	diese Arbeit
LTO1-psd	W303-1A, <i>LTO1-3Myc-AtLOV2_{E598N}-cODC1::kanMX4</i>	diese Arbeit
Matrixstämmen (Basis)		
CFD1-CTM	W303-1A, <i>CFD1-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
CIA1-CTM	W303-1A, <i>CIA1-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
CIA2-CTM	W303-1A, <i>CIA2-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
DRE2-CTM	W303-1A, <i>DRE2-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
MET18-CTM	W303-1A, <i>MET18-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
NAR1-CTM	W303-1A, <i>NAR1-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit
NBP35-CTM	W303-1A, <i>NBP35-CBP-TEV-9Myc::natNT2</i>	diese Arbeit

Zusätzlich wurden **32 weitere Stämme** zur Analyse binärer Interaktionen innerhalb des CIA-Interaktoms generiert. Diese Stämme erlauben die Koexpression zweier CIA-Faktoren mit unterschiedlichen Affinitäts-*Tags* für anschließende Interaktionsstudien. Basis für diese Matrix sind die oben aufgeführten CTM-Stämme. Diese Stämme wurden zusätzlich an einer weiteren Stelle im Genom mit einem C-terminalen 6HA-*Tag* versehen. Dabei komplementiert die 6HA-Genkassette die *HIS3*-Auxotrophie des CTM-Stammes.

5.6 Medien

5.6.1 Medium zur Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet. Das Medium wurde in dH₂O gelöst und für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Aus Selektionsgründen wurde das Medium mit Ampicillin (100 µg / ml) oder Chloramphenicol (34 µg / ml) versetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde das Medium zusätzlich mit 20 g / l Agar versetzt und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 60 °C hinzugegeben.

LB-Medium	
NaCl	10 g / l
Trypton	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l

5.6.2 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte bei 30 °C in Vollmedium (YP), Synthetischem Kompletmedium (SC) oder *low fluorescence medium* (LFM) (Taxis *et al.*, 2006). Das Medium wurde in dH₂O gelöst und für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Hinzugefügt wurden eine Kohlenstoffquelle (Galactose oder Glucose) und je nach Auxotrophie verschiedene Aminosäuren oder Antibiotika zur Selektion

(100 mg / ml ClonNAT, 200 mg / ml G418) (Janke *et al.*, 2004). Zur Herstellung von festen Nährböden wurde das Medium mit 20 g / l Agar versetzt.

YP-Medium	
Casein Pepton	20 g / l
Hefeextrakt	10 g / l
Glucose / Galactose	2 %
Aminosäuren + Supplemente	

SC-Medium (+ / - Fe)	
Yeast Nitrogen Base (+ / - Fe)	1,9 g / l
Ammoniumsulfat	5 g / l
Glucose oder Galactose	2 %
Aminosäuren + Supplemente	

Für die Kultivierung der psd-Mutanten (Fusion essentieller Gene mit photosensitivem Degron) wurde LF-Medium verwendet. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit dieser Mutanten wurde die Kultivierung weitestgehend im Dunkeln durchgeführt.

LF-Medium (LFM)	
Salz-Mix	10 %
Spurenelement-Mix	0,001 %
Vitamin-Mix	0,001 %
Glucose	2 %
Aminosäuren	

Die Zusammensetzung der jeweiligen Komponenten des LF-Mediums befindet sich im Anhang dieser Arbeit (s. Abschnitt 8.1).

Aminosäuren + Supplemente	
Adeninsulfat	80 mg / l
L-Histidin	20 mg / l
L-Leucin	60 mg / l
Uracil	20 mg / l
L-Tryptophan	40 mg / l

5.6.2.1 Kultivierung von Hefe unter anaeroben Bedingungen

Für die Kultivierung von Hefezellen unter sauerstofffreien Bedingungen wurde das Medium direkt nach dem Autoklavieren in die Anaerobenkammer eingeschleust. Das Medium und feste Nährböden wurden mehrere Tage unter anaeroben Bedingungen gelagert und vor Gebrauch mit 1xTEM-Mix versetzt.

250x TEM-Mix
50 % Ethanol
50 % Tween80
7,5 mg / ml Ergosterol
20 mg / ml L-Methionin

5.7 Molekularbiologische Methoden

5.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979). In dieser Arbeit wurde die Isolierung von Plasmid-DNA mithilfe des *NucleoSpin® Plasmid-Kit* der Firma *Macherey Nagel* durchgeführt.

5.7.2 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte aus 10 ml Vollmedium-Übernachtskultur. Die Kultur wurde 10 min bei 3000 rpm pelletiert und das Pellet in 0,9 ml Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl Zymolyase (1 mg / ml) und 1 µl 2-Mercaptoethanol versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm. Das Pellet wurde in 0,4 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 30 µl TES-Puffer versetzt. Anschließend wurde 30 min bei 60 °C inkubiert. Der Zugabe von 80 µl 5 M Kaliumacetat folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die genomische DNA wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem EtOH gefällt (5 min, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, bevor es getrocknet wurde. Zuletzt erfolgte der RNase A-Verdau (20 µg / ml RNase in TE) für 30 min bei 37 °C.

Lösung 1	TE-Puffer	TES-Puffer
10 mM K-Phosphat pH 7,4	10 mM Tris-HCl pH 8,0	0,2 mM Tris-HCl pH 8,0
0,9 M Sorbitol	1 mM EDTA	0,3 M EDTA
0,1 M EDTA		2 % (w/v) SDS

5.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit einem Agarose-Auftragspuffer versetzt und enthaltene DNA durch Zugabe von GelRed™ gefärbt. Die Visualisierung im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte mithilfe des *GDS Systems* der Firma *Intas* oder eines UV-Schirms. Die DNA-Konzentration konnte durch den

Vergleich mit dem Größenstandard *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* von *Fermentas* abgeschätzt werden.

TAE-Laufpuffer	10x Agarose-Auftragspuffer
40 mM Tris-HCl pH 8,0	0,25 % (w/v) Bromphenolblau Natriumsalz
1 mM EDTA	0,25 % (w/v) Xylencyanol FF
0,01 % (v/v) Essigsäure	30 % (v/v) Glycerin

5.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte (Mullis & Faloona, 1987). In dieser Arbeit dienten sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA aus *S. cerevisiae* als Ausgangs-DNA. Die Amplifikation von Genkassetten zur genomischen Integration in *S. cerevisiae* erfolgte gemäß Janke et al, 2004. Überdies wurde in dieser Arbeit die PCR für präparative (Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen) und analytische Zwecke (Nachweis positiver Klone im Zuge einer Klonierung) genutzt. Zur Durchführung der PCR wurden zu einem Ansatz mit der Zielsequenz folgende Komponenten hinzugegeben: Ein Oligonukleotidpaar (*forward* und *reverse primer*), das mit den flankierenden Sequenzen hybridisiert, alle vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die thermostabile Phusion® DNA-Polymerase (*Finnzymes*) und HF- oder GC-Puffer. Die Ausgangs-DNA wird dabei in sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung (*annealing*) und Elongation exponentiell vervielfacht.

5.7.5 Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen und Agarosegelen

Die Trennung von DNA und Kontaminationen (Agarose, Enzyme, Primer, Nukleotide) erfolgte durch Verwendung des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up-Kit* der Firma *Macherey-Nagel*. Eluiert wurde je nach Ansatz mit 15-30 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5.

5.7.6 Modifikation von DNA

5.7.6.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl präparative als auch analytische Spaltungen mit Typ II Restriktionsendonukleasen (*NEB*, *Fermentas*) vorgenommen. Analytische Spaltungen wurden in einem Volumen von 10 µl, präparative Spaltungen in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Dabei wurden 1-3 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Auswahl der Reaktionsbedingungen (Puffer, Inkubationszeit, Temperatur) erfolgte nach Angaben des Herstellers.

5.7.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA-Ligase von *Fermentas* verwendet. Für die Ligationsreaktion (10 µl Reaktionsvolumen) wurden 50 ng Vektor-DNA mit der 3-fachen Stoffmenge Insert-DNA ligiert. Die Verwendung der Ligase erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation in kompetente *E. coli* Zellen weiterverwendet.

5.8 Zellbiologische Methoden

5.8.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (Dagert & Ehrlich, 1979). Dabei wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 weiter inkubiert (37 °C, 150 rpm). Die Kultur wurde dann 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 25 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung + 15 % (w/v) Glycerin resuspendiert. Je 100 µl der kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

5.8.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zu 100 µl chemisch kompetenter Zellen wurden 25-100 ng Plasmid-DNA oder der gesamte Ligationsansatz gegeben und diese für 10 min auf Eis inkubiert. Dem „Hitzeschock“ (90 Sekunden, 42 °C) folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden mit 1 ml LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C (600 rpm) inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und 900 µl des Überstandes wurden verworfen. Die Zellen wurden im verbleibenden Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.8.3 Herstellung von *S. cerevisiae* Lagerungskulturen

Zur Herstellung von Lagerungskulturen wurden 1,2 ml Übernachtskultur (YP-Medium) mit 400 µl 70 % (v/v) Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen wurden bei -80 °C gelagert.

5.8.4 Transformation von *S. cerevisiae* und homologe Rekombination

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode und diente der Einführung von Plasmid-DNA oder linearer DNA-Fragmente zur homologen Rekombination (Gietz & Woods, 2002; Ito *et al.*, 1983). Dabei wurden Übernachtskulturen (YP-Medium) der Hefezellen in 50 ml frischem YP-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und die Kultur bei 30 °C und 150 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war. Die Zellen wurden geerntet (3 min, 3500 rpm), mit 10 ml dH₂O und anschließend mit 1 ml Lithiumacetat-Lösung gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und 100 µl Zellsuspension mit 2,5 µl Träger-DNA (Lachssperma-DNA, 5 min bei 95 °C denaturiert) und 1-5 µg der zu transformierenden DNA gemischt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde er mit 700 µl PEG-Lösung versetzt, gemischt und 30 min bei 42 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml dH₂O gewaschen und wieder pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl dH₂O resuspendiert und die transformierten Zellen auf SC-Platten mit entsprechenden Markern ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 3-4 Tage bei 30 °C. Einzelkolonien wurden gepickt und auf neue Selektivplatten überstrichen.

Für die homologe Rekombination wurden die Zellen nach Inkubation bei 42 °C zentrifugiert, das Pellet in 1 ml YP-Medium resuspendiert und zusätzlich 1,5 h bei 30 °C inkubiert (Erholungsphase).

Lithiumacetat-Lösung	PEG-Lösung
100 mM Lithiumacetat	100 mM Lithiumacetat
10 mM Tris-HCl pH 7,5	10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA	1 mM EDTA
	40 % (w/v) PEG 4000

5.8.4.1 Transformation von psd-Mutanten

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der psd-Mutanten wurden die Transformation, sowie die anschließende Inkubation der transformierten Zellen auf Selektivplatten weitestgehend unter Ausschluss von Licht ausgeführt.

5.8.5 Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels alkalischer Lyse

Zur Herstellung des Gesamtzellextrakts aus *S. cerevisiae* wurde 1 ml Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ von 1 geerntet (3 min, 12000 rpm, 4 °C) und das Pellet in 500 µl TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl kaltem H₂O resuspendiert, mit 75 µl Lyse-Puffer gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Fällung

der Proteine erfolgte durch Zugabe von 575 µl 50 % (w/v) TCA. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Proteine pelletiert (10 min, 12000 rpm, 4 °C) und das Pellet anschließend dreimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Das Proteinpellet wurde getrocknet, mit 60 µl Laemmli-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht.

TE-Puffer	Lyse-Puffer	Laemmli-Auftragspuffer
10 mM Tris-HCl pH 8,0	1,85 M NaOH	125 mM Tris-HCl pH 6,8
1 mM EDTA	7,4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol	10 % (v/v) Glycerin
	10 mM PMSF	2 % (w/v) SDS
		0,1 % (w/v) Bromphenolblau
		80 mM DTT

5.8.6 Präparation von Hefegesamtzellextrakt mittels Glasperlen

Zur Gewinnung größerer Mengen an Gesamtzellextrakt können die Hefezellen durch die Verwendung von Glasperlen mechanisch lysiert werden. Dabei wurden 0,5 g Zellen mit dH₂O gewaschen und in 500 µl kaltem TNETG-Puffer (+ 20 µl 100 mM PMSF + Protease Inhibitor Mix von *Roche*) resuspendiert. Nach Zugabe eines halben Volumens an Glasperlen erfolgte die Lyse der Zellen durch dreimaliges Vortexen auf höchster Stufe für jeweils 1 min. In den Pausen wurde die Probe für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugation (5 min, 3500 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation stellte das Gesamtzellextrakt dar.

TNETG-Puffer
20 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
2,5 mM EDTA
0,5 % (v/v) Triton X-100
10 % (v/v) Glycerin

5.9 Proteinbiochemische Methoden

5.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Die hier verwendete Bradford-Lösung wurde 1:5 in dH₂O verdünnt und 900 µl davon wurden mit 100 µl der zu bestimmenden Probe gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Eine Eichkurve wurde mithilfe eines Standards (0 – 100 µg BSA) erstellt.

5.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der vorliegenden Arbeit wurde das diskontinuierliche Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern zur Analyse von Proteingemischen verwendet (Laemmli, 1970). Sammelgele wurden mit 5 %, Trenngele mit 12,5 % Acrylamid gegossen. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,001 % (v/v) TEMED. Zu analysierende Proben wurden mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und gekocht (s. 5.8.5). Die Elektrophorese erfolgte 3-4 h bei 25 mA in einem vertikalen Kammersystem mit Laemmli-Laufpuffer.

Sammelgel	Trenngel	Laemmli-Laufpuffer
125 mM Tris-HCl pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (v/w) SDS
5 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid=37,5:1)	12,5 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid=37,5:1)	192 mM Glycin

5.9.3 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen

Für die Silberfärbung eines SDS-PAGE Gels wurde dieses zunächst 2 h in Fixierlösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 min in 50 % (v/v) Methanol folgte eine 2-minütige Inkubation mit Natriumthiosulfat-Lösung (0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat). Danach wurde das Gel dreimal 3 min mit dH₂O gewaschen und 25 min unter leichtem Schwenken mit Silbernitratlösung gefärbt. Anschließend wurde zweimal 1 min mit dH₂O gewaschen bevor die Entwicklungslösung hinzugegeben wurde. Nachdem die ersten Banden zu sehen waren, wurde die Färbung durch Entfernen der Entwicklungslösung und Zugabe der Stopplösung beendet.

Fixierlösung	Silbernitratlösung	Entwicklungslösung	Stopplösung
100 ml / Minigel	250 ml / Minigel	100 ml / Minigel	100 ml / Minigel
50 % (v/v) Methanol	0,2 % (w/v) Silbernitrat	6 % (w/v) Kaliumcarbonat	50 % (v/v) Methanol
0,05 % (v/v) Formaldehyd <i>extempo</i>	0,076 % (v/v) Formaldehyd <i>extempo</i>	0,05 % (v/v) Formaldehyd <i>extempo</i>	12 % (v/v) Essigsäure
12 % (v/v) Essigsäure		0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat	

5.9.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot)

Beim Western Blot werden gelelektrophoretisch getrennte Proteine auf eine Membran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). In dieser Arbeit wurden die Proteine über das sog. „semi-dry“-Verfahren von SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen überführt. Dabei wurde die dem Pluspol zugewandte Seite zunächst mit zwei in Transferpuffer getränkten *Whatman*-Filterpapieren bestückt. Darauf aufgelegt wurden die in Transferpuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran und das Gel. Abgedeckt wurde das Ganze mit zwei weiteren feuchten *Whatman*-Filterpapieren. Der Transfer erfolgte bei 120 mA für 90 min (entspricht ca. 2 mA / cm² Gel). Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA) für 2 min gefärbt.

Transferpuffer
25 mM Tris-Base
200 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,02 % (w/v) SDS

5.9.4.1 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in 1 % (w/v) BSA in TBST-Puffer unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht erfolgte bei 4 °C. Danach wurde die Membran dreimal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer erfolgte der Nachweis des HRP-Konjugats auf der Membran via ECL-Detektionslösung (*Enhanced Chemiluminescence System*) und dem *Chemostar Professional System* von *Intas*.

TBST-Puffer
10 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

5.10 Biochemische Methoden

5.10.1 Aktivitätsmessung zytosolischer Enzyme aus *S. cerevisiae*

Die Messung von Enzymaktivitäten erfolgte aus Gesamtzellextrakten nach Aufschluss der Zellen mit Glasperlen (s. 5.8.6). Dabei wurde der Umsatz eines Enzyms unter optimierten Pufferbedingungen in einem UV/VIS-Spektralphotometer bei einer definierten Wellenlänge über die Zeit verfolgt. Die benötigten Substrate und Kosubstrate wurden im Überschuss zur Reaktion gegeben. Mithilfe des Lambert-Beerschen-

Gesetzes wurde aus der Absorptionsänderung pro Zeit ($\Delta E / \Delta t$) die Enzymaktivität (E_{Akt}) berechnet. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge m konnte daraus die spezifische Aktivität (E_{spAkt}) bestimmt werden.

$$EspAkt = \frac{EAkt}{m} = \frac{\Delta E}{\Delta t * m} = \frac{\Delta E}{\Delta t * d * \varepsilon * m}$$

Die Schichtdicke d betrug 1 cm, der molare Extinktionskoeffizient ε war abhängig von der gemessenen Spezies.

5.10.1.1 Isopropylmalat Isomerase (Leu1)

Leu1 koordiniert einen [4Fe-4S]-Cluster und katalysiert den zweiten Schritt der Leucinbiosynthese, die Umwandlung von 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat (Kohlhaw, 1988). Diese Reaktion ist reversibel, mit Dimethylcitratconat als Zwischenstufe. Das Gleichgewicht liegt auf der Seite von 2-Isopropylmalat. Für die Messung der Leu1 Aktivität wurde 3-Isopropylmalat als Substrat eingesetzt und die spezifische Bildung von Dimethylcitratconat über die Absorption der Doppelbindung bei 235 nm verfolgt ($\varepsilon_{235nm} = 4530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Puffer	Substrat	Messung
20 mM Tris-HCl pH 7,4	10 mM 3-Isopropylmalat (IPM)	970 µl Puffer
50 mM NaCl		20-25 µl IPM
		5-10 µl Gesamtzellextrakt

5.10.1.2 Alkohol Dehydrogenase (ADH)

Die Alkohol Dehydrogenase diente in dieser Arbeit als zytosolisches Referenzenzym. Sie katalysiert die reversible Umwandlung von Acetaldehyd zu Ethanol im letzten Schritt der alkoholischen Gärung, wobei NADH als Kosubstrat dient. In der vorliegenden Messung wurde die Rückreaktion mit Ethanol als Substrat und NAD^+ als Kosubstrat betrachtet. Die Aktivitätsmessung basiert auf der Absorptionsänderung des Kosubstrats nach Umwandlung in NADH bei 340 nm ($\varepsilon_{340nm} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Puffer	Substrat / Kosubstrat	Messung
50 mM Tris-HCl pH 8,0	100 % Ethanol	930 µl Puffer
50 mM NaCl	50 mM NAD^+	30 µl Ethanol
		30 µl NAD^+
		10 µl Gesamtzellextrakt (1:50 verdünnt)

5.10.1.3 Sulfit Reduktase

Sulfit Reduktasen sind wichtige Enzyme des Schwefelstoffwechsels und haben u.a. eine Funktion bei der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren. Sie katalysieren die Umwandlung von Sulfit (SO_3^{2-}) zu Schwefelwasserstoff (H_2S) und H_2O . Elektronen für diese Reaktion werden durch NADPH bereitgestellt. Die assimilatorische Sulfit Reduktase der Hefe ist ein komplexes Protein, bestehend aus einer α - (Met10) und einer β -Untereinheit (Met5 / Ecm17). Die β -Untereinheit koordiniert einen [4Fe-4S]-Cluster, der Elektronen auf das Substrat übertragen kann. Der Nachweis der Sulfit Reduktase Aktivität erfolgte *in vivo* (Thomas *et al.*, 1992). Dazu wurden SC-Agarplatten mit den entsprechenden Markern und einer Kohlenstoffquelle, sowie 1 % (w/v) β -Alanin, 0,1 % (w/v) Ammoniumbismutcitrat und 0,3 % (w/v) Natriumsulfit gegossen. Die zu testenden Hefestämme wurden auf festen Nährböden kultiviert und etwas Zellmaterial mit einer gelben Pipettenspitze in 200 μl dH_2O resuspendiert. 5 μl von dieser Suspension wurden auf den Bismut-Platten für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Das von der Sulfit Reduktase gebildete Sulfid kann protoniert werden, aus der Zelle diffundieren und dabei mit Bismut zu einem braunen Präzipitat reagieren.

5.10.2 Aktivitätsmessung der mitochondrialen Aconitase aus *S. cerevisiae*

Als mitochondriale Referenz wurde die Aktivität des [4Fe-4S]-Proteins Aconitase (Aco1) aus dem Citratzyklus bestimmt. Dieses Enzym katalysiert die reversible Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat über die Zwischenstufe *cis*-Aconitat, wobei der Fe-S Cluster an der Dehydratisierung und Rehydratisierung der gebundenen Substrate beteiligt ist. Zum indirekten Nachweis der Aktivität wurde ein an die Folgereaktion im Citratzyklus gekoppelter Enzymtest durchgeführt. In dieser Reaktion katalysiert die Isocitrat Dehydrogenase (IDH) die Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat + CO_2 . NADP^+ dient dabei als Kosubstrat. Durch Verwendung von *cis*-Aconitat als Substrat wurde das Gleichgewicht in Richtung Isocitrat verschoben und aus dem Umsatz von NADP^+ konnte die Aktivität der Aconitase berechnet werden ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die unspezifische NADP^+ Reduktion wurde durch Messung einer Referenz bestimmt (Gelling *et al.*, 2008).

Puffer	Substrat / Kosubstrat / Enzym	Messung	Referenz
50 mM Triethanolamin pH 8,0	20 mM <i>cis</i> -Aconitat	950 µl Puffer	970 µl Puffer
50 mM NaCl	40 mU / µl IDH	12 µl <i>cis</i> -Aconitat	
1,5 mM MgCl ₂	100 mM NADP ⁺	10 µl IDH	
		12 µl NADP ⁺	12 µl NADP ⁺
		5 µl Gesamtzelleextrakt	5 µl Gesamtzelleextrakt

5.10.3 Bestimmung der Luciferase Aktivität

Für die Bestimmung der Luciferase Aktivität wurden Hefezellen mit einem LUX-Plasmid transformiert und für 12 h in SC-Medium, supplementiert mit entsprechenden Markern, kultiviert. Der Zellaufschluss und die Bestimmung der Luciferase Aktivität wurden unter Verwendung des *Luciferase Assay System* von *Promega* durchgeführt. Dabei wurde der CCLR-Puffer abgewandelt, um die Proteinbestimmung via Bradford-Reagenz zu erlauben. Die Aktivitäts- und Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden in 96-Loch Platten mithilfe des Lesegerätes *InfiniteR M200* von *Tecan* durchgeführt.

CCLR-Puffer
25 mM Tris-PO ₄ pH 7,8
2 mM EDTA
2 mM DTT
10 % (v/v) Glycerin
0,1 % (v/v) Triton X-100

5.10.4 Kopplung von Antikörpern an Protein A Sepharose

Das aus *Staphylococcus aureus* isolierte Protein A bindet spezifisch die F_c-Region von Antikörpern und kann somit genutzt werden, um Antikörper an Sepharosepartikel zu binden. Diese können dann zur Immunpräzipitation von Zielproteinen aus einem Gesamtzelleextrakt verwendet werden. Dabei wurden 50 mg Protein A-Sepharose mit 500 µl TNETG-Puffer für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Pelletieren (5 min, 3000 rpm, 4 °C) wurde das Antikörperserum (500 µl) hinzugegeben und 2 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel erneut pelletiert und fünfmal mit 500 µl TNETG-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde die Antikörper-gekoppelte Protein A-Sepharose (*Immunobeads*) mit 500 µl Puffer überschichtet und bis zu ihrem Gebrauch bei 4 °C gelagert.

5.10.5 (Ko)Immunpräzipitation (Ko-IP)

Die Methode der Ko-Immunpräzipitation wird zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen *in vivo* verwendet (Berggard *et al.*, 2007). Für den Nachweis von Protein-Interaktionen wurden 200-250 µl Gesamtzellextrakt mit 20-40 µl *Immunobeads* für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach dem Pelletieren (5 min, 3000 rpm, 4 °C) wurde dreimal mit 500 µl TNETG-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die *Immunobeads* in 30 µl Laemmli-Auftragspuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert.

5.10.6 Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)

Bei der Tandem-Affinitätsreinigung (*Tandem Affinity Purification*, TAP) wird ein Protein durch N- oder C-terminale Fusion mit zwei aufeinander folgenden Protein-*Tags* (z. B. Protein A und CBP, *Calmodulin Binding Peptide*) unter Verwendung zweier chromatographischer Methoden aus einem Zelllysate gereinigt (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999). Dabei werden unspezifisch bindende Proteine weitestgehend entfernt und spezifische Interaktionspartner des Köderproteins anschließend durch Western Blot oder Massenspektrometrie detektiert. Zwischen beiden *Tags* befindet sich die Erkennungssequenz für die TEV (*Tobacco Etch Virus*)-Protease: ENLYFQ'G. Diese wird zur Elution des Köderproteins von der ersten Säule (IgG-Sepharose) verwendet. Die Reinigung über eine zweite Säule (Calmodulin-Sepharose + Ca²⁺) dient der Entfernung der TEV-Protease und restlicher Kontaminationen. Der Komplex aus Köderprotein (mit CBP-*Tag*) und Interaktionspartnern kann je nach weiterer Verwendung unter nicht denaturierenden Bedingungen (EGTA) von der zweiten stationären Phase eluiert und spezifische Interaktionspartner via Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

5.10.6.1 Lyse der Hefezellen unter Verwendung der Planetenmühle

Für die Tandem-Affinitätsreinigung wurden die von Euroscarf bezogenen Stämme mit C-terminaler TAP-Fusion in YP-Medium mit Glucose kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Verwendung der Planetenmühle am EMBL in Heidelberg (Labor Anne-Claude Gavin). Dabei wurden 15 ml aufgetautes Zellpellet in 10 ml TAP-Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 25 ml Zirconia *beads* (0,5 mm) in die vorgekühlten Behälter der Planetenmühle überführt. Die Lyse erfolgte dreimal 4 min bei 350 rpm und 4 °C. Unter Verwendung einer 50 ml Spritze wurde das Lysat von den *beads* getrennt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugegefäße gegossen und 1 h bei 33500 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman Coulter XL-100K, Rotor Ti-60). Nach

Entfernung der Lipidschicht wurde das Zellextrakt in ein neues Falcon überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

TAP-Lysepuffer	1000x Proteaseinhibitor Mix
50 mM Tris-HCl pH 7,5	1 mg / ml Antipain
5 % (v/v) Glycerin	2 mg / ml Aprotinin
100 mM NaCl	16 mg / ml Benzamidin
1,5 mM MgCl ₂	1 mg / ml Leupeptin
0,2 % (v/v) Igepal	
1 mM DTT	
1 µg / ml Pepstatin A	
1 mM AEBSF	
1 x Proteaseinhibitor Mix	
1 mM PMSF	

5.10.6.2 Reinigung von Proteinkomplexen über zwei stationäre Phasen

Die Tandem-Affinitätsreinigung erfolgte bei 4 °C. Alle Puffer und Säulenmaterialien wurden auf Eis gekühlt. Zunächst wurden 400 µl IgG-Sepharose zweimal mit TAP-Lysepuffer in einem 50 ml Falcon äquilibriert und pelletiert (3 min, 1200 rpm, 4 °C) und dann mit dem aufgetauten Lysat für 2 h unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (3 min, 1200 rpm, 4 °C) wurden die *beads* in eine *Mobicol* Säule überführt. Das Säulchen wurde mit TAP-Lysepuffer aufgefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Unter Verwendung eines speziellen Verschlusses konnte dieses mit einer 10 ml Spritze verbunden werden, die als Pufferreservoir zum Waschen der Sepharose genutzt wurde. Zum Waschen mit 10 ml TAP-Lysepuffer wurde der untere Verschluss der Säule entfernt. Es folgte die Elution des Köderproteins von der IgG-Sepharose mittels TEV-Protease. Dazu wurde die IgG-Sepharose zunächst mit 4 ml TEV-Puffer äquilibriert. Nachdem der Puffer vollständig entfernt war, wurde das Säulchen unten verschlossen, die Sepharose mit 400 µl TEV-Puffer + 20 µl TEV-Protease (~4 mg / ml) überschichtet und 1 h bei 750 rpm und 16 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden 400 µl Calmodulin-Sepharose mit 3 ml TEV-Puffer + 2 mM CaCl₂ in einer neuen *Mobicol* Säule gewaschen. Danach wurde der untere Teil der Säule geschlossen und die Calmodulin-Sepharose bis zu ihrem Gebrauch mit 100 µl TEV-Puffer + 4 mM CaCl₂ überschichtet. Die Zugabe von CaCl₂ erlaubt die Bindung des Calmodulin bindenden Peptids (CBP) an die Calmodulin-Sepharose. Das Eluat der IgG-Sepharose nach TEV-Verdau wurde dann mit der äquilibrierten Calmodulin-Sepharose für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach der Bindung des Köderproteins an die zweite stationäre Phase wurde erneut mit 10 ml TEV-Puffer + 2 mM CaCl₂ gewaschen und die Säule

weitestgehend von Puffer befreit. Danach erfolgte die Elution des Köderproteins und seiner Interaktionspartner durch die Zugabe von 300 µl Glycin-Elutionspuffer zur Calmodulin-Sepharose. Die Säule wurde doppelt verschlossen und 10 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation wurde das Eluat in silikonisierten Eppendorf Reaktionsgefäßen aufgefangen (1 min, 13000 rpm) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

TEV-Protease Puffer	1x Glycin-Elutionspuffer
10 mM Tris-HCl pH 7,4	0,2 M Glycin, HCl pH 2,5
100 mM NaCl	
0,1 % (v/v) Igepal	
2 mM DTT	

5.10.6.3 Reduktion und Alkylierung von Proteinen

Um die Sequenzabdeckung zu erhöhen, wurden Proteine mit Disulfidbrücken durch Zugabe von DTT und Iodacetamid reduziert und alkyliert. Diese Reaktionen wurden direkt im Glycin-Elutionspuffer (pH 2,5) durchgeführt. Da sie quantitativ bei einem pH von 8 sind, wurde das Eluat zunächst mit NaOH an den entsprechenden pH angepasst. Nach Zugabe von DTT mit einer Endkonzentration von 5 mM wurde 60 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von Iodacetamid mit einer Endkonzentration von 7 mM. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die erneute Inkubation mit DTT (5 mM Endkonzentration) für 30 min bei Raumtemperatur diente der Tilgung des Iodacetamid Überschusses.

5.10.6.4 TCA-Präzipitation von Proteinen für die LC-MS/MS-Analyse

Die für diese Fällung verwendeten Chemikalien wurden ausschließlich in Glasflaschen aufbewahrt, um die Verunreinigung mit Polymeren zu vermeiden. Ein Teil 100 % (w/v) TCA wurde mit vier Teilen der Proteinprobe gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min, bei 13000 rpm und 4 °C wurde das Pellet einmal mit 1 ml 10 % (v/v) TCA und dreimal mit 1 ml eiskaltem Aceton (*HPLC Grade*) gewaschen, pelletiert (20 min, 13000 rpm, 4 °C) und getrocknet. Die restliche Probenvorbereitung und massenspektrometrische Analyse (LC-MS/MS) erfolgte durch die *Proteomics Core Facility* des EMBL in Heidelberg (Dr. Jan Seebacher) unter Verwendung eines LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometers (*Thermo Scientific*) (Rappsilber *et al.*, 2007).

5.10.7 Blaublicht-vermittelter Abbau von Proteinen

Die Fusion eines Zielproteins mit einem photosensitiven Degron (psd) erlaubt dessen gezielten Abbau durch Kultivierung in Blaublicht (Renicke *et al.*, 2013). Nach Abbau eines Proteins kann man dessen physiologische Relevanz bei bestimmten Prozessen *in vivo* analysieren. Um den Abbau eines Zielproteins zu verfolgen, wurden psd-Mutanten in 3 ml LF-Medium über Nacht bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 20 ml LFM-Hauptkultur (Zellkulturflaschen) mit einer OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und 4 h bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Entnahme der ersten Probe (t_0) wurde die Hauptkultur halbiert und eine Hälfte ohne, die andere mit Blaublicht (LED-Lampe, 465 nm, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkubiert. Der Proteinabbau wurde über die Zeit verfolgt. Dazu wurde pro Zeitpunkt 1 OD Zellen abgenommen und diese pelletiert (5 min, 3500 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml H₂O resuspendiert und mit 150 μl Lysepuffer gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden 150 μl 55 % (w/v) TCA hinzugefügt, wieder 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 60 μl HU-Puffer + 15 mg / ml DTT aufgenommen und die Probe 10 min bei 65 °C denaturiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 12000 rpm) wurden 10 μl des Überstandes auf ein SDS-PAGE Gel geladen und anschließend der Proteinabbau via Western Blot visualisiert.

Lysepuffer	HU-Puffer
75 μl 2-Mercaptoethanol	8 M Harnstoff
925 μl 2 M NaOH	5 % (w/v) SDS
	200 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6,8
	0,1 mM EDTA
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau

5.10.8 Bestimmung der *de novo* Fe-S Proteinreifung in *S. cerevisiae*

Bei der Bestimmung der *de novo* Fe-S Proteinreifung werden unter Eisenmangel kultivierte Hefezellen mit ⁵⁵Fe versetzt und anschließend der Einbau des radioaktiven Eisenisotops durch Immunpräzipitation von Fe-S Zielproteinen untersucht (Kispal *et al.*, 1999). Zunächst wurde dazu eine SC-Übernachtskultur geerntet (5 min, 3500 rpm), mit dH₂O gewaschen und mit einer OD₆₀₀ von 0,2 in 100-200 ml eisenfreies Minimalmedium überimpft. Nach 16-stündiger Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen erneut pelletiert und gewaschen. Je 0,5 g Zellen wurden in 10 ml frischem eisenfreien Medium resuspendiert und mit 10 μCi ⁵⁵FeCl₃ (in 100 mM Ascorbat) für 2 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Zellen wieder geerntet und mit 5 ml Citrat- sowie 5 ml Hepes-Puffer gewaschen. Nachdem die Zellen in

550 µl TNETG-Puffer resuspendiert wurden, erfolgte deren Lyse unter Verwendung von Glasperlen (s. 5.8.6). 5 µl des Lysats wurden mit 1 ml Szintillations-Cocktail gemischt, um die Eisenaufnahme in die Zelle zu quantifizieren. 25 µl Zellextrakt wurden mit 175 µl TCA-Mix (100 µl 50 % TCA + 75 µl H₂O) gefällt, zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen und nach Aufnahme in 60 µl Laemmli-Auftragspuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Visualisierung der Proteinexpressionslevel erfolgte via SDS-PAGE und Western Blot. Das gewünschte Zielprotein wurde aus dem Gesamtzellextrakt präzipitiert (s. 5.10.5) und ko-präzipitiertes ⁵⁵Fe wurde durch Zugabe eines Szintillations-Cocktails und anschließender Szintillationszählung quantifiziert. Die Radioaktivität wurde als direktes Maß für den *de novo* Fe-S Cluster-Einbau in Zielproteine verwendet.

Hepes-Puffer	Citrat-Puffer pH 7,0
20 mM Hepes-KOH pH 7,4	50 mM Na-Citrat
	5 mM EDTA

5.10.8.1 Anaerober Einbau von ⁵⁵Fe in Zielproteine

Aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit mancher Fe-S Proteine gegenüber O₂ analysiert man die *de novo* Fe-S Proteinreifung auch unter anaeroben Bedingungen. In dieser Arbeit wurden dazu sowohl die Kultivierung der Zellen (s. 5.6.2.1), als auch die Markierung mit ⁵⁵Fe und die anschließende Lyse der Zellen unter Ausschluss von O₂ durchgeführt. Alle Verbrauchsmaterialien, Puffer, Medien und Reagenzien wurden vor Gebrauch mehrere Tage in der Anaerobenkammer gelagert. Die Kultivierung der Zellen, sowie die Markierung mit ⁵⁵Fe erfolgten in 50 ml Falcons in einem Mini-Brutschrank bei 30 °C. Aufgrund der starken CO₂-Produktion im Zuge der alkoholischen Gärung der Hefe, wurden die Gefäße nicht komplett verschlossen. Die *Immunobeads* für die Immunpräzipitation des Zielproteins wurden vor Gebrauch fünfmal mit anaerobem TNETG-Puffer gewaschen.

6 Literaturangaben

Agar JN, Krebs C, Frazzon J, Huynh BH, Dean DR, Johnson MK (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**: 7856-7862

Alhebshi A, Sideri TC, Holland SL, Avery SV (2012) The essential iron-sulfur protein Rli1 is an important target accounting for inhibition of cell growth by reactive oxygen species. *Molecular biology of the cell* **23**: 3582-3590

Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ (2004) A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8658-8663

Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW (2008) Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **72**: 110-125, table of contents

Balk J, Aguilar Netz DJ, Tepper K, Pierik AJ, Lill R (2005) The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly. *Molecular and cellular biology* **25**: 10833-10841

Balk J, Lill R (2004) The cell's cookbook for iron--sulfur clusters: recipes for fool's gold? *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **5**: 1044-1049

Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *The EMBO journal* **23**: 2105-2115

Barthelme D, Scheele U, Dinkelaker S, Janoschka A, Macmillan F, Albers SV, Driessen AJ, Stagni MS, Bill E, Meyer-Klaucke W, Schunemann V, Tampe R (2007) Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *The Journal of biological chemistry* **282**: 14598-14607

Becker T, Franckenberg S, Wickles S, Shoemaker CJ, Anger AM, Armache JP, Sieber H, Ungewickell C, Berninghausen O, Daberkow I, Karcher A, Thomm M, Hopfner KP, Green R, Beckmann R (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* **482**: 501-506

Beinert H, Holm RH, Munck E (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659

Berggard T, Linse S, James P (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**: 2833-2842

Bernard DG, Netz DJ, Lagny TJ, Pierik AJ, Balk J (2013) Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **368**: 20120259

Biederbick A, Stehling O, Rosser R, Niggemeyer B, Nakai Y, Elsasser HP, Lill R (2006) Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Molecular and cellular biology* **26**: 5675-5687

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**: 1513-1523

- Bisbal C, Martinand C, Silhol M, Lebleu B, Salehzada T (1995) Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *The Journal of biological chemistry* **270**: 13308-13317
- Booker SJ, Cicchillo RM, Grove TL (2007) Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Current opinion in chemical biology* **11**: 543-552
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Bych K, Kerscher S, Netz DJ, Pierik AJ, Zwicker K, Huynen MA, Lill R, Brandt U, Balk J (2008) The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *The EMBO journal* **27**: 1736-1746
- Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, Ogilvie I, Shoubridge EA, Robinson BH (2011) Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *American journal of human genetics* **89**: 486-495
- Cavazza C, Martin L, Mondy S, Gaillard J, Ratet P, Fontecilla-Camps JC (2008) The possible role of an [FeFe]-hydrogenase-like protein in the plant responses to changing atmospheric oxygen levels. *Journal of inorganic biochemistry* **102**: 1359-1365
- Chan MK, Kim J, Rees DC (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science* **260**: 792-794
- Chanet R, Heude M (2003) Characterization of mutations that are synthetic lethal with pol3-13, a mutated allele of DNA polymerase delta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **43**: 337-350
- Chen CK, Chan NL, Wang AH (2011) The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends in biochemical sciences* **36**: 553-561
- Chen ZQ, Dong J, Ishimura A, Daar I, Hinnebusch AG, Dean M (2006) The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *The Journal of biological chemistry* **281**: 7452-7457
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research* **31**: 3497-3500
- Choi H, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz A, Mellacheruvu D, Fermin D, Qin ZS, Tyers M, Gingras AC, Nesvizhskii AI (2011) SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. *Nature methods* **8**: 70-73
- Choi H, Liu G, Mellacheruvu D, Tyers M, Gingras AC, Nesvizhskii AI (2012) Analyzing protein-protein interactions from affinity purification-mass spectrometry data with SAINT. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]* **Chapter 8**: Unit8 15
- Claret L, Calder SR, Higgins M, Hughes C (2003) Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Molecular microbiology* **48**: 1349-1355

- Coelho CM, Kolevski B, Walker CD, Lavagi I, Shaw T, Ebert A, Leever SJ, Marygold SJ (2005) A genetic screen for dominant modifiers of a small-wing phenotype in *Drosophila melanogaster* identifies proteins involved in splicing and translation. *Genetics* **171**: 597-614
- Collins SR, Kemmeren P, Zhao XC, Greenblatt JF, Spencer F, Holstege FC, Weissman JS, Krogan NJ (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 439-450
- Craig EA, Marszalek J (2002) A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**: 1658-1665
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* **14**: 1188-1190
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28
- Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H, Hinnebusch AG (2004) The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **279**: 42157-42168
- Fan F, Macnab RM (1996) Enzymatic characterization of Flil. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry* **271**: 31981-31988
- Gari K, Leon Ortiz AM, Borel V, Flynn H, Skehel JM, Boulton SJ (2012) MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* **337**: 243-245
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, Edelmann A, Heurtier MA, Hoffman V, Hoefert C, Klein K, Hudak M, Michon AM, Schelder M, Schirle M, Remor M, Rudi T, Hooper S, Bauer A, Bouwmeester T, Casari G, Drewes G, Neubauer G, Rick JM, Kuster B, Bork P, Russell RB, Superti-Furga G (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631-636
- Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Hofert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141-147
- Gelling C, Dawes IW, Richhardt N, Lill R, Muhlenhoff U (2008) Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Molecular and cellular biology* **28**: 1851-1861
- Gerber J, Neumann K, Prohl C, Muhlenhoff U, Lill R (2004) The yeast scaffold proteins Isu1p and Isu2p are required inside mitochondria for maturation of cytosolic Fe/S proteins. *Molecular and cellular biology* **24**: 4848-4857
- Ghaemmighami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391

Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* **350**: 87-96

Haunhorst P, Hanschmann EM, Brautigam L, Stehling O, Hoffmann B, Muhlenhoff U, Lill R, Berndt C, Lillig CH (2013) Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Molecular biology of the cell* **24**: 1895-1903

Hausmann A, Aguilar Netz DJ, Balk J, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R (2005) The eukaryotic P loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3266-3271

Hausmann A, Samans B, Lill R, Muhlenhoff U (2008) Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *The Journal of biological chemistry* **283**: 8318-8330

Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sorensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183

Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* **77**: 755-776

Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature protocols* **7**: 1534-1550

Ingolia NT, Ghaemmamghami S, Newman JR, Weissman JS (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**: 218-223

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* **153**: 163-168

Ito S, Tan LJ, Andoh D, Narita T, Seki M, Hirano Y, Narita K, Kuraoka I, Hiraoka Y, Tanaka K (2010) MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Molecular cell* **39**: 632-640

Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962

Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* **74**: 247-281

Kaplan CD, Kaplan J (2009) Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chemical reviews* **109**: 4536-4552

Karcher A, Buttner K, Martens B, Jansen RP, Hopfner KP (2005) X-ray structure of RLI, an essential twin cassette ABC ATPase involved in ribosome biogenesis and HIV capsid assembly. *Structure* **13**: 649-659

Karcher A, Schele A, Hopfner KP (2008) X-ray structure of the complete ABC enzyme ABCE1 from *Pyrococcus abyssi*. *The Journal of biological chemistry* **283**: 7962-7971

Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**: 241-254

Kerr ID (2004) Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochemical and biophysical research communications* **315**: 166-173

Khoshnevis S, Gross T, Rotte C, Baierlein C, Ficner R, Krebber H (2010) The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBO reports* **11**: 214-219

Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO journal* **18**: 3981-3989

Kispal G, Sipos K, Lange H, Fekete Z, Bedekovics T, Janaky T, Bassler J, Aguilar Netz DJ, Balk J, Rotte C, Lill R (2005) Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *The EMBO journal* **24**: 589-598

Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T, Pellegrini L (2007) An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nature structural & molecular biology* **14**: 875-877

Koenig T, Menze BH, Kirchner M, Monigatti F, Parker KC, Patterson T, Steen JJ, Hamprecht FA, Steen H (2008) Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *Journal of proteome research* **7**: 3708-3717

Kohlhaw GB (1988) Isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods in enzymology* **166**: 423-429

Kou H, Zhou Y, Gorospe RM, Wang Z (2008) Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15714-15719

Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, Punna T, Peregrin-Alvarez JM, Shales M, Zhang X, Davey M, Robinson MD,

Paccanaro A, Bray JE, Sheung A, Beattie B, Richards DP, Canadien V, Lalev A, Mena F, Wong P, Starostine A, Canete MM, Vlasblom J, Wu S, Orsi C, Collins SR, Chandran S, Haw R, Rilstone JJ, Gandhi K, Thompson NJ, Musso G, St Onge P, Ghanny S, Lam MH, Butland G, Altaf-Ul AM, Kanaya S, Shilatifard A, O'Shea E, Weissman JS, Ingles CJ, Hughes TR, Parkinson J, Gerstein M, Wodak SJ, Emili A, Greenblatt JF (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-643

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1050-1055

Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R (2001) An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* **2**: 715-720

Lauder S, Bankmann M, Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996) Dual requirement for the yeast MMS19 gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Molecular and cellular biology* **16**: 6783-6793

Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of molecular biology* **317**: 41-72

Li H, Mapolelo DT, Dingra NN, Naik SG, Lees NS, Hoffman BM, Riggs-Gelasco PJ, Huynh BH, Johnson MK, Outten CE (2009) The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* **48**: 9569-9581

Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838

Lill R, Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* **22**: 457-486

Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual review of biochemistry* **77**: 669-700

Liu G, Zhang J, Choi H, Lambert JP, Srikumar T, Larsen B, Nesvizhskii AI, Raught B, Tyers M, Gingras AC (2012) Using ProHits to store, annotate, and analyze affinity purification-mass spectrometry (AP-MS) data. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]* **Chapter 8**: Unit8 16

Liu G, Zhang J, Larsen B, Stark C, Breitkreutz A, Lin ZY, Breitkreutz BJ, Ding Y, Colwill K, Pasulescu A, Pawson T, Wrana JL, Nesvizhskii AI, Raught B, Tyers M, Gingras AC (2010) ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nature biotechnology* **28**: 1015-1017

Luo D, Bernard DG, Balk J, Hai H, Cui X (2012) The DUF59 family gene AE7 acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**: 4135-4148

Macnab RM (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et biophysica acta* **1694**: 207-217

- Malkin R, Rabinowitz JC (1966) The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochemical and biophysical research communications* **23**: 822-827
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**: 1059-1069
- Milkereit P, Strauss D, Bassler J, Gadai O, Kuhn H, Schutz S, Gas N, Lechner J, Hurt E, Tschochner H (2003) A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4072-4081
- Minamino T, Imada K, Namba K (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Molecular bioSystems* **4**: 1105-1115
- Minamino T, Kazetani K, Tahara A, Suzuki H, Furukawa Y, Kihara M, Namba K (2006) Oligomerization of the bacterial flagellar ATPase FliI is controlled by its extreme N-terminal region. *Journal of molecular biology* **360**: 510-519
- Minamino T, Namba K (2004) Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **7**: 5-17
- Muhlenhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, Zhang Y, Stubbe J, Pierrel F, Herrero E, Lillig CH, Lill R (2010) Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell metabolism* **12**: 373-385
- Muhlenhoff U, Richter N, Pines O, Pierik AJ, Lill R (2011) Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**: 41205-41216
- Mulder DW, Shepard EM, Meuser JE, Joshi N, King PW, Posewitz MC, Broderick JB, Peters JW (2011) Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Structure* **19**: 1038-1052
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**: 335-350
- Mumberg D, Muller R, Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122
- Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, Landa J, Font A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Ugarte M, Gutierrez-Solana LG, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Vaquerizo J, Riudor E, Briones P, Elpeleg O, Ribes A, Lill R (2011) A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American journal of human genetics* **89**: 656-667
- Netz DJ, Mascarenhas J, Stehling O, Pierik AJ, Lill R (2013) Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends in cell biology*
- Netz DJ, Pierik AJ, Stumpfig M, Bill E, Sharma AK, Pallesen LJ, Walden WE, Lill R (2012a) A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 12365-12378

- Netz DJ, Pierik AJ, Stumpfig M, Muhlenhoff U, Lill R (2007) The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nature chemical biology* **3**: 278-286
- Netz DJ, Stith CM, Stumpfig M, Kopf G, Vogel D, Genau HM, Stodola JL, Lill R, Burgers PM, Pierik AJ (2012b) Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nature chemical biology* **8**: 125-132
- Netz DJ, Stumpfig M, Dore C, Muhlenhoff U, Pierik AJ, Lill R (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nature chemical biology* **6**: 758-765
- Nicolet Y, Fontecilla-Camps JC (2012) Structure-function relationships in [FeFe]-hydrogenase active site maturation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 13532-13540
- Noma A, Suzuki T (2006) Ribonucleome analysis identified enzyme genes responsible for wybutosine synthesis. *Nucleic acids symposium series*: 65-66
- Pallesen LJ, Solodovnikova N, Sharma AK, Walden WE (2013) Interaction with Cfd1 increases the kinetic lability of FeS on the Nbp35 scaffold. *The Journal of biological chemistry* **288**: 23358-23367
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567
- Pisareva VP, Skabkin MA, Hellen CU, Pestova TV, Pisarev AV (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *The EMBO journal* **30**: 1804-1817
- Pondarre C, Antiochos BB, Campagna DR, Clarke SL, Greer EL, Deck KM, McDonald A, Han AP, Medlock A, Kutok JL, Anderson SA, Eisenstein RS, Fleming MD (2006) The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis. *Human molecular genetics* **15**: 953-964
- Prakash L, Prakash S (1977) Isolation and characterization of MMS-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **86**: 33-55
- Pugh RA, Honda M, Leesley H, Thomas A, Lin Y, Nilges MJ, Cann IK, Spies M (2008) The iron-containing domain is essential in Rad3 helicases for coupling of ATP hydrolysis to DNA translocation and for targeting the helicase to the single-stranded DNA-double-stranded DNA junction. *The Journal of biological chemistry* **283**: 1732-1743
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218-229
- Py B, Barras F (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nature reviews Microbiology* **8**: 436-446
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols* **2**: 1896-1906

- Rees DC (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annual review of biochemistry* **71**: 221-246
- Rees DC, Howard JB (2003) The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* **300**: 929-931
- Renicke C, Schuster D, Usherenko S, Essen LO, Taxis C (2013) A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chemistry & biology* **20**: 619-626
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* **17**: 1030-1032
- Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F (2013) Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta* **1827**: 455-469
- Rouault TA (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology* **2**: 406-414
- Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *The EMBO journal* **22**: 4826-4835
- Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJ, White MF (2006) The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular cell* **23**: 801-808
- Schrader EK, Harstad KG, Matouschek A (2009) Targeting proteins for degradation. *Nature chemical biology* **5**: 815-822
- Seki M, Takeda Y, Iwai K, Tanaka K (2013) IOP1 protein is an external component of the human cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) machinery and functions in the MMS19 protein-dependent CIA pathway. *The Journal of biological chemistry* **288**: 16680-16689
- Sharma AK, Pallesen LJ, Spang RJ, Walden WE (2010) Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *The Journal of biological chemistry* **285**: 26745-26751
- Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Netz DJ, Kerscher S, Elsasser HP, Wittig I, Balk J, Brandt U, Lill R (2009) Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Molecular and cellular biology* **29**: 6059-6073
- Shoemaker CJ, Green R (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: E1392-1398
- Silverman RH (2007) A scientific journey through the 2-5A/RNase L system. *Cytokine & growth factor reviews* **18**: 381-388
- Sipos K, Lange H, Fekete Z, Ullmann P, Lill R, Kispal G (2002) Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *The Journal of biological chemistry* **277**: 26944-26949

- Snoek IS, Steensma HY (2006) Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome. *FEMS yeast research* **6**: 393-403
- Soler N, Craescu CT, Gallay J, Frapart YM, Mansuy D, Raynal B, Baldacci G, Pastore A, Huang ME, Vernis L (2012) A S-adenosylmethionine methyltransferase-like domain within the essential, Fe-S-containing yeast protein Dre2. *The FEBS journal* **279**: 2108-2119
- Soler N, Delagoutte E, Miron S, Facca C, Baille D, d'Autreaux B, Craescu G, Frapart YM, Mansuy D, Baldacci G, Huang ME, Vernis L (2011) Interaction between the reductase Tah18 and highly conserved Fe-S containing Dre2 C-terminus is essential for yeast viability. *Molecular microbiology* **82**: 54-67
- Srinivasan V, Netz DJ, Webert H, Mascarenhas J, Pierik AJ, Michel H, Lill R (2007) Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure* **15**: 1246-1257
- Stehling O, Lill R (2013) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**: a011312
- Stehling O, Mascarenhas J, Vashisht AA, Sheftel AD, Niggemeyer B, Rosser R, Pierik AJ, Wohlschlegel JA, Lill R (2013) Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell metabolism* **18**: 187-198
- Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJ, Pierik AJ, Wohlschlegel JA, Lill R (2012) MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* **337**: 195-199
- Strain J, Lorenz CR, Bode J, Garland S, Smolen GA, Ta DT, Vickery LE, Culotta VC (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *The Journal of biological chemistry* **273**: 31138-31144
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Müller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic acids research* **39**: D561-568
- Taxis C, Maeder C, Reber S, Rathfelder N, Miura K, Greger K, Stelzer EH, Knop M (2006) Dynamic organization of the actin cytoskeleton during meiosis and spore formation in budding yeast. *Traffic* **7**: 1628-1642
- Teschner J, Lachmann N, Schulze J, Geisler M, Selbach K, Santamaria-Araujo J, Balk J, Mendel RR, Bittner F (2010) A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant cell* **22**: 468-480
- Thomas D, Barbey R, Henry D, Surdin-Kerjan Y (1992) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *Journal of general microbiology* **138**: 2021-2028
- Thompson JW, Bruick RK (2012) Protein degradation and iron homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* **1823**: 1484-1490

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354
- Trost B, Moore SA (2009) Statistical characterization of the GxxxG glycine repeats in the flagellar biosynthesis protein FliH and its Type III secretion homologue YscL. *BMC microbiology* **9**: 72
- Urzica E, Pierik AJ, Muhlenhoff U, Lill R (2009) Crucial role of conserved cysteine residues in the assembly of two iron-sulfur clusters on the CIA protein Nar1. *Biochemistry* **48**: 4946-4958
- van Wietmarschen N, Moradian A, Morin GB, Lansdorp PM, Uringa EJ (2012) The mammalian proteins MMS19, MIP18, and ANT2 are involved in cytoplasmic iron-sulfur cluster protein assembly. *The Journal of biological chemistry* **287**: 43351-43358
- Vernis L, Facca C, Delagoutte E, Soler N, Chanet R, Guiard B, Faye G, Baldacci G (2009) A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PloS one* **4**: e4376
- von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B (2003) STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research* **31**: 258-261
- Wachtershauser G (2007) On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chemistry & biodiversity* **4**: 584-602
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC, Volz K (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* **314**: 1903-1908
- Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS (2006) Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1763**: 668-689
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010) Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**: 790-795
- White MF, Dillingham MS (2012) Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Current opinion in structural biology* **22**: 94-100
- Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, Li Y, Allis CD, Tempst P, Svejstrup JQ (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular cell* **4**: 123-128
- Xie LX, Ozeir M, Tang JY, Chen JY, Jaquinod SK, Fontecave M, Clarke CF, Pierrel F (2012) Overexpression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *The Journal of biological chemistry* **287**: 23571-23581
- Xu C, Min J (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & cell* **2**: 202-214

- Yarunin A, Panse VG, Petfalski E, Dez C, Tollervey D, Hurt EC (2005) Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO journal* **24**: 580-588
- Yeeles JT, Cammack R, Dillingham MS (2009) An iron-sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase-nucleases. *The Journal of biological chemistry* **284**: 7746-7755
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 599-604
- Zhai C, Li Y, Mascarenhas C, Lin Q, Li K, Vyrides I, Grant CM, Panaretou B (2013) The function of ORAOV1/LTO1, a gene that is overexpressed frequently in cancer: essential roles in the function and biogenesis of the ribosome. *Oncogene*
- Zhang Y, Liu L, Wu X, An X, Stubbe J, Huang M (2011) Investigation of in vivo diferric tyrosyl radical formation in *Saccharomyces cerevisiae* Rnr2 protein: requirement of Rnr4 and contribution of Grx3/4 AND Dre2 proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**: 41499-41509
- Zhang Y, Lyver ER, Nakamaru-Ogiso E, Yoon H, Amutha B, Lee DW, Bi E, Ohnishi T, Daldal F, Pain D, Dancis A (2008) Dre2, a conserved eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis. *Molecular and cellular biology* **28**: 5569-5582
- Zhao Z, Fang LL, Johnsen R, Baillie DL (2004) ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications* **323**: 104-111
- Zheng L, White RH, Cash VL, Dean DR (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **33**: 4714-4720
- Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2754-2758
- Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* **415**: 88-92

7 Abkürzungsverzeichnis

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
C-Terminus	Carboxyterminus
Cam	Chloramphenicol
CBP	Calmodulin-bindendes Peptid
CHX	Cycloheximid
CIA	<i>cytosolic iron-sulfur protein assembly</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTD	carboxyterminale Domäne
CTM	CBP-TEV-9Myc
Da	Dalton
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe-S	Eisen-Schwefel
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GSH	Glutathion
HA	Hämagglutinin
IB	Immunoblot
IP	Immunpräzipitation
ISC	<i>iron-sulfur cluster</i>
kb	Kilobasenpaar
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LF	<i>low fluorescence</i>
M	molar (mol / l)
M	Molmasse
MS	Massenspektrometrie
N-Terminus	Aminoterninus
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
nt	Nukleotid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
psd	photosensitives Degron
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SC	<i>synthetic complete</i> (Minimalmedium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	<i>Tandem-Affinity Purification</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
U	<i>Unit</i>
v / v	Volumen pro Volumen
w / v	Gewicht pro Volumen
w. E.	willkürliche Einheiten
WT	Wildtyp
YP	<i>Yeast peptone</i> (Vollmedium)

8 Anhang

8.1 Komponenten LF (*low fluorescence*)-Medium

10x Salz-Mix	
KH ₂ PO ₄	10 g / l
MgSO ₄	5 g / l
NaCl	1 g / l
CaCl ₂	1 g / l
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g / l

10000x Spurenelement-Mix	
H ₃ BO ₄	50 mg / 100 ml
CuSO ₄	4 mg / 100 ml
KI	10 mg / 100 ml
FeCl ₃	20 mg / 100 ml
MnSO ₄	40 mg / 100 ml
Na ₂ MoO ₄	20 mg / 100 ml
ZnSO ₄	40 mg / 100 ml

10000x Vitamin-Mix	
Biotin	0,2 mg / 100 ml
Calcium Pantothenensäure	40 mg / 100 ml
Inositol	200 mg / 100 ml
Niacin	40 mg / 100 ml
para-Aminobenzoensäure	20 mg / 100 ml
Pyroxidin HCl	40 mg / 100 ml
Thiamin HCl	40 mg / 100 ml

8.2 TAP-MS Daten

8.2.1 Liste der allgemeinen Kontaminationen der TAP-MS

Tab. 8.1 Liste der *S. cerevisiae* Proteine, die in mehr als 3 % der erfolgreichen Tandem-Affinitätsreinigungen vorgekommen sind (Gavin *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006). Diese Proteine wurden als nicht-spezifische Kontaminationen behandelt und aus der Datenmenge aussortiert. Interaktionen ribosomaler Proteine untereinander oder mit Translationsfaktoren wurden in den damals publizierten Netzwerken daher nicht berücksichtigt. Auch Chaperone, die aufgrund ihrer natürlichen Funktion mit vielen Proteinen interagieren, wurden aus diesen Datensets entfernt.

Name	Systematischer Name	Name	Systematischer Name	Name	Systematischer Name
AAP1	Q0080 mito	RPL23A	YBL087C	RPS21B	YJL136C
ACT1	YFL039C	RPL24A	YGL031C	RPS22A	YJL190C
BRR2	YER172C	RPL24B	YGR148C	RPS23A	YGR118W
CDC19	YAL038W	RPL25	YOL127W	RPS24A	YER074W
CEX1	YOR112W	RPL26A	YLR344W	RPS24B	YIL069C
CYS4	YGR155W	RPL26B	YGR034W	RPS25A	YGR027C
DED1	YOR204W	RPL27B	YDR471W	RPS26A	YGL189C
DIA2	YOR080W	RPL28	YGL103W	RPS26B	YER131W
EFT1	YOR133W	RPL2B	YIL018W	RPS27B	YHR021C
EFT2	YDR385W	RPL3	YOR063W	RPS28B	YLR264W
ENO1	YGR254W	RPL30	YGL030W	RPS29A	YLR388W
ENO2	YHR174W	RPL31A	YDL075W	RPS29B	YDL061C
FAS1	YKL182W	RPL31B	YLR406C	RPS3	YNL178W
GBP2	YCL011C	RPL32	YBL092W	RPS4A	YJR145C
GPM1	YKL152C	RPL33A	YPL143W	RPS4B	YHR203C
HHF1	YBR009C	RPL33B	YOR234C	RPS5	YJR123W
HSP60	YLR259C	RPL35B	YDL136W	RPS6B	YBR181C
HSP78	YDR258C	RPL36A	YMR194W	RPS7A	YOR096W
IDP3	YNL009W	RPL37A	YLR185W	RPS7B	YNL096C
IMD2	YHR216W	RPL37B	YDR500C	RPS8A	YBL072C
IMD3	YLR432W	RPL38	YLR325C	RPS9B	YBR189W
IMD4	YML056C	RPL39	YJL189W	RPT1	YKL145W
IMH1	YLR309C	RPL42B	YHR141C	RRP5	YMR229C
KAR2	YJL034W	RPL4A	YBR031W	RVB1	YDR190C
KEM1	YGL173C	RPL4B	YDR012W	RVS167	YDR388W
LSM12	YHR121W	RPL5	YPL131W	SHP1	YBL058W
NPI46	YML074C	RPL6A	YML073C	SIS1	YNL007C
PAB1	YER165W	RPL6B	YLR448W	SMC1	YFL008W
PDC1	YLR044C	RPL7A	YGL076C	SRO9	YCL037C
PFK26	YIL107C	RPL7B	YPL198W	SSA1	YAL005C
PGK1	YCR012W	RPL8A	YHL033C	SSA2	YLL024C
PKC1	YBL105C	RPL8B	YLL045C	SSA4	YER103W
PRP8	YHR165C	RPL9A	YGL147C	SSB1	YDL229W
PRT1	YOR361C	RPL9B	YNL067W	SSB2	YNL209W
PSA1	YDL055C	RPN1	YHR027C	SSE1	YPL106C
RHR2	YIL053W	RPN2	YIL075C	STM1	YLR150W
RPL10	YLR075W	RPP0	YLR340W	SUI3	YPL237W
RPL11B	YGR085C	RPS0A	YGR214W	SWD2	YKL018W
RPL12B	YDR418W	RPS0B	YLR048W	TDH3	YGR192C
RPL13A	YDL082W	RPS10B	YMR230W	TEF1	YPR080W
RPL13B	YMR142C	RPS11B	YBR048W	TEF2	YBR118W
RPL14B	YHL001W	RPS12	YOR369C	TSC11	YER093C
RPL15A	YLR029C	RPS13	YDR064W	TUB1	YML085C
RPL16A	YIL133C	RPS14A	YCR031C	TUB2	YFL037W
RPL16B	YNL069C	RPS15	YOL040C	URA2	YJL130C
RPL17A	YKL180W	RPS16B	YDL083C	VMA2	YBR127C
RPL17B	YJL177W	RPS17A	YML024W	VMA4	YOR332W
RPL18B	YNL301C	RPS17B	YDR447C	VPS8	YAL002W
RPL19B	YBL027W	RPS18A	YDR450W	YAR009C	YAR009C
RPL20A	YMR242C	RPS19B	YNL302C	YDJ1	YNL064C
RPL20B	YOR312C	RPS1A	YLR441C	YTA7	YGR270W
RPL21A	YBR191W	RPS1B	YML063W		
RPL21B	YPL079W	RPS2	YGL123W		
RPL22A	YLR061W	RPS20	YHL015W		

8.2.2 Gene Ontology (GO)-Analyse

Tab. 8.2 Die TAP-MS Daten wurden durch eine Gene Ontology-Analyse zusammengefasst und ähnliche Proteine in Clustern dargestellt. Proteine desselben Clusters gehören entweder dem gleichen biologischen Prozess (BP) an, teilen die gleiche molekulare Funktion (MF) oder dasselbe zelluläre Kompartiment (CC).

Cluster-Name	GO-Term	P-Wert	Annotierte Komponenten	Detektierte Komponenten	Ontologie	Beschreibung
RPN7	GO:0000502	3,38E-40	39	39	CC	Proteasom-Komplex
RPS3	GO:0030529	4,12E-68	135	121	CC	Ribonukleoprotein-Komplex
SSA1	GO:0006457	1,27E-12	21	12	BP	Proteinfaltung
HHF1	GO:0005694	8,49E-30	46	37	CC	Chromosom
ATP3	GO:0005743	7,21E-17	10	9	CC	Innere Mitochondriale Membran
RLI1	GO:0003743	1,00E-10	7	6	MF	Translationsinitiation
CIA1	GO:0000417	6,25E-07	4	4	CC	HIR-Komplex
ISD11	GO:0016226	8,86E-06	8	3	BP	Fe-S Cluster-Assemblierung
ENO1	GO:0000015	2,84E-08	4	4	CC	Phosphopyruvat Hydratase-Komplex
KAR2	GO:0044432	2,83E-22	25	18	CC	Endoplasmatisches Retikulum
MDY2	GO:0007029	6,63E-08	4	4	BP	ER-Organisation

8.3 Multisequenzvergleich der Proteine Yae1 und Lto1

1	MSNTWDDWV ASDSSTT-- --ERSPLAVK LRENHFRY LDGIVSSKEE KLQEGFNDGF PTGAKLGKQV GIIMGILIG RTRFGDEDED LSKAYIDQK EIRINKVLK	51	101
Saccer	MADLLDDWV GSGDLDLST -RELSPILLK LKDNHFRY LDGIVSSKEE KLQEGFNDGF PTGAKLGKQV GIIMGILIG EYRYGKDDEE LKDFNNKQ EIQHNILTK		
Cangla	MTVMTDEEN IWGSDNAST GPQESLAVK LQQLHFRY LDGIVSSKEE KLQEGFNDGF PTGAKLGKQV GEIVGKLRLE TTYLGNADPQ VAADLKQD EIRINRVLSA		
Klulac	MSCE-DDWLN TSDDEKHGV FGGSLLQK LERTENRY LDGIVSSKEE KLQEGFNDGF PTGAKLGKQV GEIVGKLRLE DSIPLGAQDSE LRSDYKELA QQLISRVLTH		
Ashgos	MSA LGSDSDTEF KEISSTYHR VQEKVATISY ADGVADGREK VFQSFDEGF ENGFKTGEL AKLSAFYETI SNAAGAESSE WNAE-REAYQ KQLADATNK		
Dromel	MSDIWDEE VRETSPSITR VKRDHQAISY LAGVTAKADE SLQEGFNAGY PIGGQLGLSI GRIFGYLQG -----KG LVEEEKQLRK ELSSTRIFDR		
Yarlip	MTSPQTNSLD DIFGSPPEH GEKFSQASI EAPSPSLPS LRQEVTAISY RDGVSAARKE HVQGFDAF PIGAQLGMRA GTVIGIIEG LRGFESPTAS RAVKFKLRK EEGQ--GIEP		
Aspfum	MSWVQ ---VVANRSN EDIFDEADE MYPVQKWNIN TMRKRIKESY RDGVSAARKE ALQEGFNQGY RQGAELMVAC QGFRTLNAL LSWCHLNHDG SAL-RKINN LEVI--GKHE		
Galgal	MSWVQA ASLVQGPTEE RDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Bostau	MSWVR APLVRGPTEE GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Canlup	MSWVRA SPLVPGPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Equcab	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Homsap	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Macmul	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Musmus	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Danrer	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Aratha	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
Consensus	MSWVQA ASLVQGPPEG GDVFDEADE SLVQREWRS HMQRRVKEGY RDGIDAGKAV TLQQGFNQGY KEGAEIINY GQLRGTLSAL LSWCHLNHDG SALISKINN LDVA--GQCE		
121	SIFDPNFDLQ -E-KHPLITK WTDIANTYCE KYHVPISQ	171	221
Saccer	RIFTEDYNLE -DSKHVPVSK WEEIVTKYCE KYNVKTE		
Cangla	RHFDEELQPL -DSLKVLKLS WQARVLDTYEG KYS		
Klulac	ANFSEQMDAT -EALSSLLAR WEGALVKYTS RYIPNV		
Ashgos	AHFTYLEHQG -APLNVISEK QKTYVDLLG KLAQQLPATT NLFTSGSDSS VNVV		
Dromel	QYWTDAAPT YEGVHPLVKQ WENKIDVMKR E		
Yarlip	DEAAARQAK REQLLRILYQK AVKELEVRV FAGSEESTR DNGEQKEPEV VLRKQDAVI SQWEEQVRVA HWEENMAALE PKEDEKRAST PTEQI		
Aspfum	EDLLKCLNSV QLQP--NVGD ILDSIQNMDL SHIAPAGVDC SEVKAER-YG HVGSS-DEMC CRNNGEDGSL QFDCNREKLF TDPDKSTLAW VKKQTVWLVE QLGLSLDLH HIQQLHEH		
Galgal	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Bostau	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Canlup	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Equcab	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Homsap	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Macmul	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Musmus	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Danrer	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Aratha	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		
Consensus	EYVLRLHLSI TSQP--HVVD LLDSIQMDL CHVPAEAKI DEVKDER-FC ENNAEFNMKC SKNLSQVDCS SLKCCRAQEH ACNPENSLTW ILEQTASLVK QLGVSVDILQ HLKQL		

Abb. 8.1 Multisequenzvergleich Yae1. Sequenzen der Yae1-Homologen verschiedener Organismen wurden verglichen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus fumigatus*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Equus caballus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Macaca mulatta*, *Danio rerio*, und *Arabidopsis thaliana*). Der Vergleich wurde mit *ClustalW* erstellt und konservierte Reste markiert (Chenna *et al.*, 2003). Rot: saure Aminosäurereste, blau: basisch, gelb: unpolar / hydrophob. Grün: deka-GX₃-Domäne.

Anhang

	1	51	101
Saccer	MVRNRFIRKM KKNLFKSNHL SYLKSQKVK ITGQIKMD	YQSGFLEGG NENIKQSFLE GKQYGLQVGF QRETLGQME GLC----	IESYGLHSPT LKNIHTIRT LMKGLK----
Cangla		YQSGVEEGR NENLKNLLE GKQYGLQVGF QRETLGQMV GMC-----	LDLQLKNNLS LFNIANVRE LSSIE----
Klulac		YQSGVEEGR NENLKNLLE GKQYGLQVGF QRETLGQMV GIC-----	LIQ-RFDAA LQNAKVKID LIEEIQ----
Ashgos		YQSGVEEGR RENLQNNLVE GKQYGLQVGF QRYSELGHMK GIC-----	L-KLVHDTF VENTINELIN MITRT-----
Yarlip	M PAIPTEMKQH -----	YQSGVNDGL QAGTKAGFAE GREFGVQTV QRELDLGLLQ GRVIVNEEQV	ADLPESKQKQ TVERQQIQK LHQEPTTYF
Aspfum	ME -----	YQSGVNLGA TDGAQAGYTE GSVFAVEKGF EKFELEGLRY GKALVWAQRL	ADSEISRNSS QESDQTDTRK SQPYNEGDLL
Dromel	MTS PSRDINDL	YQSGVEEGL KDGQEQNTE GYKLGYAQGV SLGEELGKIL QVVVAQQQLK	HTD-----K VRSELEQLS LIEEF-----
Galgai	MAA PSAG-SIM	YQSGVQEGY ABGSHAGAAE GRRCALHGA KIGSEIGSYL GFALTWQHLL	PKCTDEKDSK KMAADSLIG MIQKF-----
Bostau	MAGD-QIM	YQSGVREGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRGLL	HSCATERDSK KMAVIEALIG MIQKF-----
Canlup	MAGS-QIM	YQSGVREGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	HTCTTERDSK KMAESLIE MIQKF-----
Homsap	MAGS-QIM	YQSGVREGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	HSCATERDSK KMAVIEALIG MIQKF-----
Equcab	MAD AIVMAKXKVK	YQSGVQEGY EBGSTLGIIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	HTCAAEKDSK KMAVIEALIG LIEKF-----
Musmus	AVE-QIM	YQSGVQEGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	HSGAGEKDSK KMAVIEALIG LIQDF-----
Macmul	MAGS-QIM	YQSGVREGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	HSCATERDSK KMAVIEALIG MIQKF-----
Danrer	MAF EPNN-DIL	YQSGVQEGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	QSSTDVKARK RMAVIEALIG VIQNF-----
Aratha	MS SGLN-EDIL	YQSGVQEGY EBGSSLGMIIE GRQHGTLHGA KIGSEIGCYQ GFAPAWRCLL	RIDPTREFSQ LKHINDFHV LLDKI-----
Consensus
	131	181	231
Saccer	MNNDESVMF FERVLIKLN	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	RTQPPAAQT--LRLARHTD STVPRLALTS LWFLD-THNI QDLCPFCPITT DKASLKAPAW FRQTPQGWL SSKQCDERTD
Cangla	LNNKEENVES LEKTLVKLN	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Klulac	MDNNQENVAI YEKSLFKLN	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Ashgos	LDNNSNSATE YEQAIRVFN	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Yarlip	LSNDSVVVHQ YETMMKKANA	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Aspfum	LEFFVCKEML FLESSSLAK	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Dromel	--RTMDQAD TVGAVQDHS	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Galgai	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Bostau	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Canlup	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Homsap	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Equcab	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Musmus	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Macmul	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Danrer	--YDDPTYDK LHEDDLKING	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Aratha	--LLDPEDET KDGIKDDLAV	YRTAASIG SEKVVFEDELL KGYTEENIE DNF	
Consensus
Saccer			
Cangla			
Klulac			
Ashgos			
Yarlip			
Aspfum	SSSGVINDDR		
Dromel			
Galgai			
Bostau			
Canlup			
Homsap			
Equcab			
Musmus			
Macmul	KRCEYFQTVP GSQR		
Danrer			
Aratha			
Consensus		

Abb. 8.2 Multisequenzvergleich Lto1. Sequenzen der Lto1-Homologen verschiedener Organismen wurden verglichen (*Saccharomyces cerevisiae* [veraltete Sequenz mit verlängertem N-Terminus], *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus fumigatus*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Equus caballus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Macaca mulatta*, *Danio rerio*, und *Arabidopsis thaliana*). Der Vergleich wurde mit *ClustalW* erstellt und konservierte Reste markiert (Chenna *et al.*, 2003). Rot: saure Aminosäurereste, blau: basisch, gelb: unpolar / hydrophob. Grün: deka-GX₃-Domäne.

9 Publikationen

Paul, V.D., Stümpfig, M., Taxis, C., Renicke C., Pierik, A.J. & Lill, R. (2014). **Dedicated maturation factors for the essential ribosome-associated Fe-S protein Rli1** (*Manuskript in Vorbereitung*).

Paul, V.D. & Lill, R. (2014). **The impact of iron-sulfur protein biogenesis on genome stability** *FEBS Lett.* (*Manuskript in Vorbereitung*).

Mascarenhas, J., Paul, V.D., Seebacher, J., Kugler, K.G., Kötter, P., Zörnig, M., Gavin, A.C., Pierik, A.J. & Lill, R. (2014). **Cia2 assembles iron-sulfur clusters by direct interaction with cytosolic and nuclear apoproteins** (*Manuskript in Vorbereitung*).

Pierik, A.J., Netz, D.J.A., Paul, V.D. & Lill, R. (2014). **P-loop NTPases in metalloprotein maturation** *Trends Biochem. Sci.* (*to be submitted*).

10 Tagungsbeiträge (Auswahl)

Paul, V.D., Seebacher, J., Gavin, A.C., Pierik, A.J. & Lill, R.: **Function and dynamics of the CIA interactome** (Poster), 6th International Conference on Biogenesis of Iron Sulphur Proteins, August 2011, Cambridge (GB).

Paul, V.D.: **How the CIA targeting complex affects DNA repair and nuclear genome integrity** (Vortrag), Klausurtagung SFB 593, Februar 2012, Hirscheegg (A).

Paul, V.D.: **Two new components of cytosolic iron-sulfur cluster assembly?** (Vortrag), Klausurtagung GRK1216 Intra- und Interzellulärer Transport und Kommunikation, September 2012, Hirscheegg (A).

Molik, S., Paul, V.D., Rietzschel, N., Lill, R.: **The fabulous world of eukaryotic Fe-S clusters: small, but essential for life** (Poster), International Meeting: Endosymbiosis from Prokaryotes to Eukaryotic Organelles, Oktober 2012, München.

Paul, V.D., Pierik, A.J., Lill, R.: **Two adaptor CIA proteins required for the Fe-S clusters of the essential ribosomal protein Rli1** (Poster), Gordon Research Conference on Cell Biology of Metals, Juli 2013, Newport, Rhode Island (USA).

Paul, V.D.: **Two new CIA proteins required for the maturation of the ribosomal Fe-S protein Rli1** (Vortrag), Klausurtagung SFB 593, Oktober 2013, Hirschegg (A).

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der **Justus-Liebig Universität Gießen** waren die Damen und Herren:

Bindereif, Clauss, Dorresteyn, Eggert, Forchhammer, Forreiter, Friedhoff, Friedrich, Gerlich, Hipke, Holz, Hughes, Jäger, Jauker, Klug, Kröger, Lakes-Harlan, Leers, Meiß, Pingoud, Renkawitz, Schreiner, Spengler, Stenzel, van Bel und Wolters.

12 Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich in dieser spannenden Phase meines Lebens begleitet haben.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Prof. Dr. Roland Lill richten, der mich während der gesamten Zeit mit seinem Rat unterstützt hat und bereit war durch den immerwährenden Austausch den maximalen Fortschritt dieser Arbeit zu ermöglichen. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Person und meine Arbeit, sowie die Möglichkeit meine Ergebnisse auf zahlreichen Tagungen im In- und Ausland zu präsentieren, möchte ich herzlich Danke sagen.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Antonio Pierik danke ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, die immer wieder Antrieb für neue Richtungen in der Doktorarbeit gaben, die Vermittlung seiner ausgefeilten Klonierstrategien und die Bereitstellung der Daten seiner bioinformatischen Analysen.

Ein großer Dank geht an dieser Stelle auch an unseren Laborleiter PD Dr. Ulrich Mühlenhoff, der mir während der gesamten Zeit am Institut mit wertvollen Tipps im Laboralltag zur Seite stand. Für seinen beispiellosen Einsatz besonders am Ende der Arbeit und das Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bedanken.

Meinen Kollaborationspartnern am EMBL in Heidelberg Dr. Anne-Claude Gavin, Dr. Jan Seebacher, Dr. Karl Kugler und Dr. Sebastian Kühner spreche ich meinen Dank für die Hilfe bei der systematischen Interaktionsanalyse aus.

Dr. Christof Taxis und Christian Renicke an der Universität Marburg danke ich für die Bereitstellung ihres lichtinduzierbaren Degrons, sowie ihrer Geräte und die freundliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Dem gesamten Institut für Zytobiologie möchte ich für die Unterstützung innerhalb sowie außerhalb des Laboralltages danken. Der offene und freundliche Umgang miteinander, sowie die Hilfsbereitschaft in vielerlei Hinsicht haben dazu beigetragen, dass ich mich hier immer wohl gefühlt habe. Ein herzliches Dankeschön geht an dieser Stelle vor allem an unsere technischen Assistenten, unsere Sekretärin Gisela Lesch und unsere frühere Kollegin Gabriele Köpf für deren Hilfe bei wissenschaftlichen, wie auch organisatorischen Belangen.

Meiner guten Freundin Nicole danke ich für unzählige Momente während unserer gemeinsamen Zeit am Institut, an die ich mich immer gerne zurück erinnern werde. Sie spielte eine ganz besondere Rolle auf dem Weg meiner Promotion, denn nicht nur aus wissenschaftlicher Sicht sondern auch persönlich war sie für mich eine sehr große Unterstützung. Ebenso möchte ich meiner Kollegin Marta für die vielen Augenblicke danken, die uns in den letzten Jahren oft zum Lachen gebracht und uns zu guten Freundinnen gemacht haben.

Für die Finanzierung meiner Arbeit danke ich dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, sowie dem Sonderforschungsbereich 593 „Mechanismen der zellulären Kompartimentierung und deren krankheitsrelevante Veränderungen“.

Als assoziiertes Mitglied des Graduiertenkolleg 1216 „Intra- und interzellulärer Transport und Kommunikation (IITC)“ bedanke ich mich bei den Organisatoren Herrn Prof. Dr. Uwe Maier und Lucette Claudet. Im Rahmen der Seminare konnte ich mich mit anderen Doktoranden austauschen und somit Einblicke in Methoden gewinnen, die z.T. auch in meiner eigenen Arbeit Anwendung fanden.

Meinem Freund und meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre Einzigartigkeit und die Fähigkeit, mich immer zum Lachen zu bringen. Danke, dass ihr mich auf diesem Weg unterstützend begleitet habt. Ihr seid wundervoll!

Ein herzlicher Dank geht an alle übrigen Menschen, denen ich auf dem Weg meiner Promotion begegnet bin und die mich sowohl beruflich als auch privat inspiriert haben.